

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA PASQUALIM

**ESTUDO DA MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO COM
APLICAÇÃO DERMOCOSMÉTICA**

CURITIBA

2015

PATRICIA PASQUALIM

**ESTUDO DA MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO SALICILICO COM
APLICAÇÃO DERMOCOSMÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Sandra Maria Warumby Zanin
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Josiane de Fátima Gaspari Dias

CURITIBA

2015

Pasqualim, Patricia

Estudo da microencapsulação de ácido salicílico com aplicação
dermocosmética / Patricia Pasqualim – Curitiba, 2015.

103 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professora Dra. Sandra Maria Warumby Zanin

Coorientadora: Professora Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do
Paraná, 2015.

Inclui bibliografia

1. Ácido Salicílico. 2. Microencapsulação. 3.Cera de Abelha. I. Zanin,
Sandra Maria Warumby. II. Dias, Josiane de Fátima Gaspari. III.
Universidade Federal do Paraná. IV. Título.


CDD 668.55


TERMO DE APROVAÇÃO

PATRICIA PASQUALIM

Título: "ESTUDO DA MICROENCAPSULAÇÃO DE ÁCIDO SALICÍLICO COM APLICAÇÃO DERMOCOSMÉTICA"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.


Profa. Dra. Sandra Maria Warumby Zanin
Orientadora


Profa. Dra. Ana Luisa Lacava Lordello
Universidade Federal do Paraná


Prof. Dr. Paulo Vitor Farago
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Curitiba, 25 de fevereiro de 2015.

*Ao meu marido, Bruno Goulart
Vasconcelos, por todo apoio, dedicação e
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, benção e proteção.

A meu marido, pelo amor, paciência e incentivo durante todos os momentos.

A meus pais e irmã, pelo amor, apoio e dedicação em toda a caminhada.

À professora Sandra Maria Warumby Zanin, orientadora e amiga, e ao seu esposo, Pedro Zanin, pela acolhida, paciência, dedicação, confiança e auxílio durante o trabalho.

Às professoras Josiane de Fátima Gaspari Dias, co-orientadora, e à Gislene Mari Fugiwara pela colaboração no trabalho.

À professora Marilis Dallarmi Miguel, pelas palavras oportunas nos momentos difíceis.

Aos professores Paulo Vitor Farago e Jessica Mendes Nadal, por todo o apoio na execução das análises efetuadas na UEPG e pela disposição no auxílio à interpretação dos resultados.

As alunas de Iniciação Científica, Letícia da Mata Lazinski e Mayra Bruna Fedalto, pelo auxílio nos experimentos realizados.

Aos meus colegas do laboratório de Farmacotécnica e Fitoquímica, em especial Vinícius Bednarczuk, pela colaboração nos experimentos de CLAE.

Ao professor Jorge Guido Chociai e à Maria de Jesus, pelo empréstimo de equipamentos.

Ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelas análises realizadas.

À Universidade Federal do Paraná pela estrutura concedida para a execução deste trabalho.

Aos professores Paulo Vitor Farago e Ana Luisa Lacava Lordello pelo aceite para a correção e composição da banca de defesa dessa dissertação.

A todos os amigos, colegas e professores que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las... Que
tristes os caminhos se não fora a presença
distante das estrelas!”

Mario Quintana

RESUMO

A microencapsulação de ativos, muito presente nas áreas farmacêutica e cosmética, é capaz de mascarar odores/sabores, estabilizar fármacos, aumentar a tolerância gastrointestinal ou ainda, promover a liberação prolongada de ativos. O ácido salicílico, um β -hidroxiácido, é utilizado no tratamento de diversas condições da pele como acne, verrugas, psoríase, entre outras hiperqueratoses. Com função dermocosmética, o ácido salicílico necessita de formulações com baixo pH para sua estabilização, reduzindo o número de formas farmacêuticas disponível. Assim, a utilização da técnica de microencapsulação mostra-se adequada para esse fim. As ceras e óleos são opções como materiais encapsulantes, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, de baixa toxicidade, inertes, de fácil processamento e baixo custo. Visto que os lipídios podem apresentar polimorfismo, ou seja, se cristalizar de diferentes formas, criando estruturas distintas, que modificam a liberação do princípio ativo encapsulado, é importante que a forma polimórfica com maior potencial de encapsulação do ativo seja obtida. A cristalização dos lipídios pode ocorrer em estruturas tridimensionais denominadas α , β e β' . As formas α e β' recristalizam na forma termodinamicamente estável β . Assim, a estabilidade termodinâmica das partículas e seu grau de empacotamento lipídico aumentam, enquanto a incorporação do princípio ativo diminui na ordem forma polimórfica α , β' e β , sendo que misturas de acilgliceróis proporcionam maior capacidade de incorporação que lipídios puros. Dessa forma, nesse trabalho, a cera de abelha foi associada ao óleo de mamona para a microencapsulação do ácido salicílico, a fim de se obter uma forma polimórfica menos estável pela mistura de diferentes cadeias lipídicas, com maior incorporação do ativo. Para isso, as variáveis críticas ao processo de encapsulação foram determinadas e uma formulação proposta. Pela metodologia de microscopia eletrônica de varredura as partículas obtidas foram analisadas morfológicamente. Já pelas técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial e Difração de Raios X verificou-se a presença do ácido nas partículas, com amorfização e distribuição uniforme, a nível molecular. Além disso, não foram verificadas ligações químicas entre os materiais utilizados e o ácido salicílico, verificado pela Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier. Por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência o ácido salicílico encapsulado) e aquele não encapsulado foi quantificado e valores comparáveis a titulação ácida indireta foram obtidos, com variação entre as metodologias inferior a 5%. Com a nova metodologia proposta, cerca de 80% do ácido salicílico pode ser encapsulado, obtendo-se partículas adequadas ao uso dermatológico.

Palavras-chave: Ácido Salicílico. Microencapsulação. Cera de abelha.

ABSTRACT

Microencapsulation, commonly useful in pharmaceutical and cosmetic areas, can mask odors / flavors, stabilizes drugs, increases gastrointestinal tolerance or promotes sustained release. Salicylic acid, a β –hydroxyacid is used in the treatment of various skin conditions as acne, warts, psoriasis and other hyperkeratosis. As a dermocosmetic, it requires formulations with low pH for his stabilization, reducing the number of dosage forms available. Thereby, microencapsulation proves to be advantageous for this purpose. Waxes and fats are suitable choices as encapsulating materials since they are biocompatible, biodegradable, inert, easy processing and low cost. Since lipids may exhibit polymorphism, crystallizing in different ways, creating distinct structures, which modify the release of the active, it is important to obtain that polymorph with the highest potential of active encapsulation. Crystallization can occur in the three-dimensional lipid structures called α , β and β' . α and β recrystallizes in the thermodynamically stable form β . The thermodynamic stability of the particles and their degree of lipid packing increases, while the incorporation of the active ingredient decreases in this order α , β' and β . Glycerides mixtures provide greater incorporation capability than pure lipids. In this work, beeswax was associated with castor oil for the microencapsulation of salicylic acid in order to obtain a less stable polymorphic form by mixing different lipid chains, with more active content. For this, the critical variables to the encapsulation process were determined and a formulation proposed. The morphology of the particles was analyzed by optical and scanning electron microscopy. The techniques of Differential Scanning Calorimetry and X-ray diffraction verified the presence of the acid in the particles with amorphization and uniform distribution, on the molecular level. In addition, chemical bonds were not observed between the materials used and salicylic acid, verified by spectroscopy in the infrared Fourier Transform. By High Performance Liquid Chromatography the encapsulated salicylic acid and that remainder were quantified and comparable amounts to indirect acid titration were obtained, ranging from the methodologies less than 5%. With the proposed new methodology, about 80% of salicylic acid may be encapsulated, giving suitable particles for dermatological proposes.

Keywords: Salicylic Acid. Microencapsulation. Beeswax.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESTRUTURA MICROSCÓPICA E CAMADAS DA PELE.....	20
FIGURA 2 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA.....	21
FIGURA 3 -	ESTRUTURA QUÍMICA DE UM TRIGLICERÍDEO.....	22
FIGURA 4 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO SALICÍLICO.....	26
FIGURA 5 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MICROPARTÍCULAS.....	32
FIGURA 6 -	CLASSIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS.....	43
FIGURA 7 -	PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS POR MEIO DO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO.....	46
FIGURA 8 -	FLUXOGRAMA DEMONSTRATIVO DAS VARIAÇÕES NA METODOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	54
FIGURA 9 -	RECRISTALIZAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO NA FASE EXTERNA AQUOSA DO SISTEMA EMULSIONADO NO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EM CERA DE ABELHA.....	63
FIGURA 10 -	CRISTAIS VISÍVEIS MACROSCOPICAMENTE AO FINAL DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO.....	64
FIGURA 11 -	VARIAÇÕES NA PROPORÇÃO CERA DE ABELHA:ÓLEO DE MAMONA PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	66
FIGURA 12 -	VARIAÇÕES NA PORCENTAGEM DE TENSOATIVO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	69
FIGURA 13 -	VARIAÇÕES NO VOLUME DE ÁGUA PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	71
FIGURA 14 -	VARIAÇÕES NA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	73
FIGURA 15 -	VARIAÇÕES NO TEMPO DE EMULSIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS.....	75
FIGURA 16 -	DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS.....	77
FIGURA 17 -	MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÁCIDO SALICÍLICO APÓS PROCESSO DE SECAGEM.....	78
FIGURA 18 -	FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO SALICÍLICO E SEUS CONSTITUINTES.....	79
FIGURA 19 -	CURVA DE CED DO ÁCIDO SALICÍLICO.....	82
FIGURA 20 -	CURVA DE CED DA CERA DE ABELHA.....	83

FIGURA 21 -	CURVA DE CED DA MICROPARTÍCULA CONTENDO ÁCIDO SALICÍLICO.....	83
FIGURA 22 -	CURVA DE CED DA MICROPARTÍCULA SEM ÁCIDO SALICÍLICO.....	84
FIGURA 23 –	DIFRATOGRAMAS DA CERA DE ABELHA, ÁCIDO SALICÍLICO E DAS MICROPARTÍCULAS SEM E COM ÁCIDO SALICÍLICO E ÓLEO DE MAMONA.....	85
FIGURA 24 -	ESPECTROS DE IVTF DA CERA DE ABELHA, ÁCIDO SALICÍLICO, MICROPARTÍCULAS SEM E COM ÁCIDO SALICÍLICO E ÓLEO DE MAMONA.....	86
FIGURA 25 -	CROMATOGRAMA EM CLAE DO ÁCIDO SALICÍLICO RECUPERADO DAS MICROPARTÍCULAS.....	90
FIGURA 26 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO PARA AMOSTRAS DILUÍDAS EM METANOL.....	91
FIGURA 27 -	CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO PARA AMOSTRAS DILUÍDAS EM METANOL:ÁGUA.....	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS TRÊS FORMAS MAIS COMUNS DE POLIMORFISMO EM TRIACILGLICERÓIS.....	36
TABELA 2 -	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ADEQUADA CERA DE ABELHA:ÓLEO.....	53
TABELA 3 -	EFICIÊNCIA DE MICROENCAPSULAÇÃO EM DIFERENTES PROPORÇÕES CERA DE ABELHA: ÓLEO DE MAMONA.....	67
TABELA 4 -	VARIAÇÕES NA PORCENTAGEM DE TENSOATIVO.....	69
TABELA 5 -	VARIAÇÕES NO VOLUME DE ÁGUA PARA EMULSIFICAÇÃO.....	70
TABELA 6 -	VARIAÇÕES NA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO.....	74
TABELA 7 -	VARIAÇÕES NO TEMPO DE EMULSIFICAÇÃO.....	76
TABELA 8 -	DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS.....	77
TABELA 9 -	TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DAS MICROPARTÍCULAS.....	89
TABELA 10 -	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE % DE ENCAPSULAÇÃO OBTIDOS POR CLAE E TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DO ÁCIDO SALICÍLICO RECUPERADO DAS PARTÍCULAS.....	91
TABELA 11 -	COMPARAÇÃO DOS VALORES DE % DE ENCAPSULAÇÃO OBTIDOS POR CLAE E TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DO ÁCIDO SALICÍLICO PRESENTE NA ÁGUA DE PROCESSO.....	92

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

%	- porcentagem
®	- marca registrada
µL	- microlitros
µm	- micrômetros
Å	- Angstrom
CED	- Calorimetria Exploratória Diferencial
CFL	- conjugado fármaco-lipídio
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLN	- carreador lipídico nanoestruturado
DNA	- ácido desoxirribonucleico
DRX	- Difractometria de Raios X
EHL	- equilíbrio hidrofílico-lipofílico
g	- gramas
HA	- hidroxíácido
IVTF	- Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
K	- Kelvin
KBr	- brometo de potássio
kV	- quilovolts
Log P	- coeficiente de partição octanol-água
M	- molar
m/m	- massa/massa
mA	- miliampere
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	- miligrama
min	- minuto
mL	- mililitros
mL.min ⁻¹	- mililitros por minuto
mm	- milímetro
NLS	- nanopartículas lipídicas sólidas
nm	- nanômetros

n°	- número
$^{\circ}\text{C}$	- graus Celsius
p/p	- peso / peso
p/v	- peso / volume
pH	- potencial hidrogeniônico
PM	- peso molecular
rpm	- rotações por minuto
v/v	- volume / volume
UV	- ultravioleta
α	- alfa
β	- beta
β'	- beta linha
βHA	- β -hidroxiácido
βi	- beta i
γ	- gama
δ	- delta
$\Delta H_{\text{fusão}}$	- variação de entalpia de fusão
θ	- teta
λ	- delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO GERAL.....	18
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 PELE	19
3.2 ÓLEOS E GORDURAS	22
3.2.1 Óleo de Mamona	23
3.2.2 Ceras	23
3.2.2.1 Cera de Abelha	25
3.3 ÁCIDO SALICÍLICO	26
3.4 TENSOATIVOS	30
3.5 MICROENCAPSULAÇÃO	31
3.5.1 Sistemas lipídicos.....	33
3.5.1.1 Polimorfismo Lipídico	35
3.5.1.2 Natureza e concentração do lipídio	40
3.5.1.3 Natureza e concentração do tensoativo	41
3.5.1.4 Solubilidade do princípio ativo	41
3.5.1.5 Temperatura e volume da solução aquosa	42
3.5.1.6 Classificação das partículas lipídicas	42
3.5.1.7 Aplicações das partículas lipídicas sólidas.....	44
3.5.1.8 Método de microencapsulação por emulsificação/solidificação	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 MATERIAL	49
4.1.1 Reagentes	49
4.1.2 Equipamentos	49
4.2 MÉTODOS	50
4.2.1 Pureza do ácido salicílico	50
4.2.2 Solubilidade do ácido salicílico	50
4.2.3 Obtenção das micropartículas lipídicas sólidas	51
4.2.3.1 Variações na metodologia	51
4.2.3.1.1 Adição de óleo à matriz cerosa	51
4.2.3.1.2 Adição de água no processo de preparo das partículas.....	52
4.2.3.2 Rendimento de produção dos das partículas	55
4.2.3.3 Caracterização das partículas	55
4.2.3.3.1 Tamanho e morfologia.....	55
4.2.4 Eficiência de microencapsulação	56
4.2.4.1 Análise qualitativa	56
4.2.4.1.1 Análise de Difração de Raios X	56
4.2.4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	56
4.2.4.1.3 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	57
4.2.4.2 Análise quantitativa	57
4.2.4.2.1 Titulação direta	58
4.2.4.2.2 Titulação indireta	58
4.2.4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61

5.1 PUREZA DO ÁCIDO SALICÍLICO	61
5.2 SOLUBILIDADE DO ÁCIDO SALICÍLICO	61
5.3 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO	62
5.3.1 Micropartículas lipídicas de ácido salicílico	62
5.3.1.1 Variáveis críticas ao processo de obtenção das partículas	63
5.3.1.1.1 Parâmetro proporção de cera de abelha – óleo de mamona	63
5.3.1.1.2 Parâmetro porcentagem de tensoativo	68
5.3.1.1.3 Parâmetro volume de água para emulsificação	70
5.3.1.1.4 Parâmetro velocidade de agitação	72
5.3.1.1.5 Parâmetro tempo de emulsificação	74
5.3.1.2 Análises microscópicas	76
5.3.1.2.1 Análise da distribuição de tamanho e morfologia das micropartículas por microscopia óptica	76
5.3.1.2.2 Análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura	78
5.3.1.3 Rendimento das micropartículas	80
5.3.2 Eficiência de microencapsulação	80
5.3.2.1 Análises qualitativas	80
5.3.2.1.1 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)	81
5.3.2.1.2 Análise de Difração de Raios X (DRX)	84
5.3.2.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)	86
5.3.2.2 Análises quantitativas	88
5.3.2.2.1 Titulação direta	88
5.3.2.2.2 Titulação indireta	88
5.3.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	89
6 CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

Há décadas, formulações contendo hidroxiácidos (HAs) são utilizadas para o tratamento de diversas condições da pele como acne, verrugas, psoríase, entre outras hiperqueratoses. Dentre eles, destacam-se os ácidos salicílico, glicólico e láctico, em concentrações que variam de 2 a 70%. Atualmente, esses ácidos são também utilizados em cosméticos com a finalidade de minimização do envelhecimento da pele (KORNHAUSER *et.al.*, 2009).

Segundo Kornhauser e colaboradores (2009), em seu estudo sobre o efeito da aplicação tópica dos ácidos salicílico e glicólico em eritema induzido pela radiação ultravioleta, danos ao DNA e na formação de “sunburn cells”, o ácido salicílico apresentou melhores resultados quando comparado aos demais, uma vez que não induziu nenhum desses processos, enquanto que o ácido glicólico demonstrou aumento da sensibilidade da pele à radiação ultravioleta (UV) nas condições investigadas.

O ácido salicílico, um β HA, em aplicações cosméticas, é considerado seguro a 2% em formulações para permanência na pele (cremes faciais e corporais) e enxaguáveis (removedores de maquiagem, géis de banho, shampoos e condicionadores); a 1% em produtos para permanência no cabelo e como conservante em outros produtos cosméticos a 0,5% (SCCNFP, 2002). Apesar disso, artigos citam o uso de 25-30% em veículo hidroalcoólico como um agente esfoliante químico superficial para a acne e o fotoenvelhecimento leve (KLIGMAN, 2001) ou ainda 0,5-60% para diversas funções (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008).

Devido a sua baixa solubilidade em água, bem como ao seu pH ácido (TOXNET, 2013), tem seu uso em formulações dermatológicas limitado pois exige que as mesmas possuam pH semelhante ao seu.

Nos últimos anos, tem-se observado um aumento no número de produtos que utilizam a tecnologia de encapsulação de ativos, seja a nível de micro ou nanoencapsulação. Para isso, diversas técnicas podem ser aplicadas como polimerização, gelificação, coacervação, coalescência, solidificação ou ainda evaporação (PONCELET, 2006).

A técnica de microencapsulação de substâncias é muito utilizada por diversas áreas, como a farmacêutica e a cosmética devido as suas vantagens como mascarar odores/sabores, estabilizar fármacos, aumentar a tolerância gastrointestinal, ou ainda, promover liberação prolongada do ativo (CALERO *et.al.*, 2008; CHAN; LIM; HENG, 2000; MAGILL, 1991; PONCELET, 2006). Entretanto, essas técnicas, em sua maioria, exigem o uso de solventes orgânicos tóxicos ou calor, que limitam a sua utilização. Assim, polímeros naturais e biodegradáveis como o alginato e a quitosana, bem como excipientes farmacêuticos como as ceras são desejáveis para esse fim (GIFANI *et. al.*, 2009; RIBEIRO *et.al.*, 1999).

As ceras e óleos são biocompatíveis, pouco tóxicas, toleráveis *in vivo*, inertes, de fácil processamento e baixo custo. Dentre elas, destaca-se a cera de abelha, com alta reprodutibilidade e ausente de solventes orgânicos, descrita em diversos trabalhos como material encapsulante de ativos farmacêuticos (GIFANI *et. al.*, 2009). Esta, bem como outros materiais lipídicos sólidos relacionados, durante o processo de encapsulação formam matrizes, que dispersam ou dissolvem um ativo e promovem o retardo de sua liberação (LIBERAL, 2008).

A obtenção de partículas lipídicas sólidas consiste no processo rotineiro para formação de emulsões óleo em água, com utilização de parte da água do processo resfriada à aproximadamente 8°C. Com esta condição, as gotículas da fase interna da emulsão solidificam e são posteriormente separadas dos demais componentes do sistema por centrifugação ou filtração. Após a secagem das partículas no meio ambiente, elas passam a ter comportamento de pó (PASSERINI, 2003).

Os lipídios podem apresentar polimorfismo, ou seja, se cristalizar de diferentes formas, criando estruturas distintas, modificando assim a liberação do princípio ativo encapsulado. A cristalização dos lipídios pode ocorrer em estruturas tridimensionais denominadas α , β e β' (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; SILVA; ESCOBEDO, GIOIELLI, 2008).

Durante o processo de resfriamento, se a recristalização ocorrer sob a forma pouco estável e ordenada dos lipídios (α), as moléculas de ativo irão preferencialmente se localizar nas zonas amorfas, ou seja, naquelas menos organizadas na matriz cristalina. Já, se o rearranjo cristalino conduzir a forma mais estável β , esse aumento na organização da estrutura lipídica resultará em redução das regiões desorganizadas, levando a expulsão do ativo encapsulado. Esse último fenômeno ocorre também em matrizes lipídicas compostas por apenas um tipo de

lipídio, levando a formação de cristais perfeitamente ordenados, com poucos defeitos (LACERDA, 2009).

Assim, a estabilidade termodinâmica das partículas e seu grau de empacotamento lipídico aumentam, enquanto a incorporação do princípio ativo diminui na ordem forma polimórfica α , β' e β (SOUTO *et.al.*, 2011).

Essa organização tridimensional da matriz lipídica é dependente de diversos fatores como velocidade de resfriamento da emulsão, composição de lipídios e sua concentração (SOUTO *et.al.*, 2011).

Além disso, a concentração de tensoativo, solubilidade do ativo, temperatura e volume da solução aquosa também são fatores que influenciam características como dimensão da partícula, retenção de princípio ativo e eficiência de encapsulação (SOUTO *et.al.*, 2011).

Considerando todos esses fatores, bem como as vantagens da cera de abelha como material para a encapsulação e do uso da tecnologia de microencapsulação na estabilização de ativos para a administração tópica, o objetivo deste estudo foi, a partir da técnica descrita por Gifani e colaboradores (2009), microencapsular o ácido salicílico com melhora na porcentagem de retenção do ativo. Para isso, associado à cera de abelha, um óleo foi utilizado para compor a matriz lipídica, aumentando a solubilização do ativo nessa e ainda alterando a recristalização dos lipídios que a compõem, aumento a eficiência de encapsulação do sistema.

2 OBJETIVO GERAL

Estabelecer os parâmetros adequados à obtenção de micropartículas de ácido salicílico com finalidade dermocosmética.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as características físico-químicas do ácido salicílico.

Pesquisar e avaliar as técnicas e materiais encapsulantes para a microencapsulação do ácido salicílico.

Microencapsular o ácido salicílico conforme a técnica mais adequada.

Avaliar as micropartículas obtidas quanto ao tamanho e morfologia.

Determinar o rendimento de produção das micropartículas.

Determinar a eficiência de microencapsulação.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PELE

A pele ou tegumento externo, limite anatômico de um organismo, é o mais acessível e o maior sistema orgânico do corpo. Constitui um revestimento barreira funcional, maleável e elástico (CHIEN, 1992; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991), eficiente tanto contra agressões externas provocadas por microrganismos e radiação, como também internas, prevenindo a perda de água e de proteínas para o exterior (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999; KEDE; SABATOVICH, 2004; PERSSONELLE, 2004). Microscopicamente, é um órgão multiestratificado composto de, anatomicamente, várias camadas histológicas (CHIEN, 1992) demonstradas na Figura 1. Entretanto, é geralmente descrita em termos de três camadas teciduais que, em corte perpendicular de fora para dentro, denominam-se epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é dividida em duas porções distintas, a epiderme viável, composta de uma camada hidrofílica (70% de água) e o estrato córneo, hidrofóbico (12-20% de água), constituído por células que não apresentam sinais vitais. A derme é constituída por uma camada hidrofílica irrigada por vasos sanguíneos e possui fibras de colágeno e elastina que fornecem resistência mecânica ao tecido cutâneo. A hipoderme ou tecido gorduroso subcutâneo é constituída por células de gordura denominadas de adipócitos. Além disso, possui penetrações verticais dos apêndices, tais como o folículo piloso e as glândulas sudoríparas e sebáceas (BAUMANN, 2004; BOLZINGER *et al* 2012; CHIEN, 1992; KERMANY, 2010; PERSSONELLE, 2004; VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991).

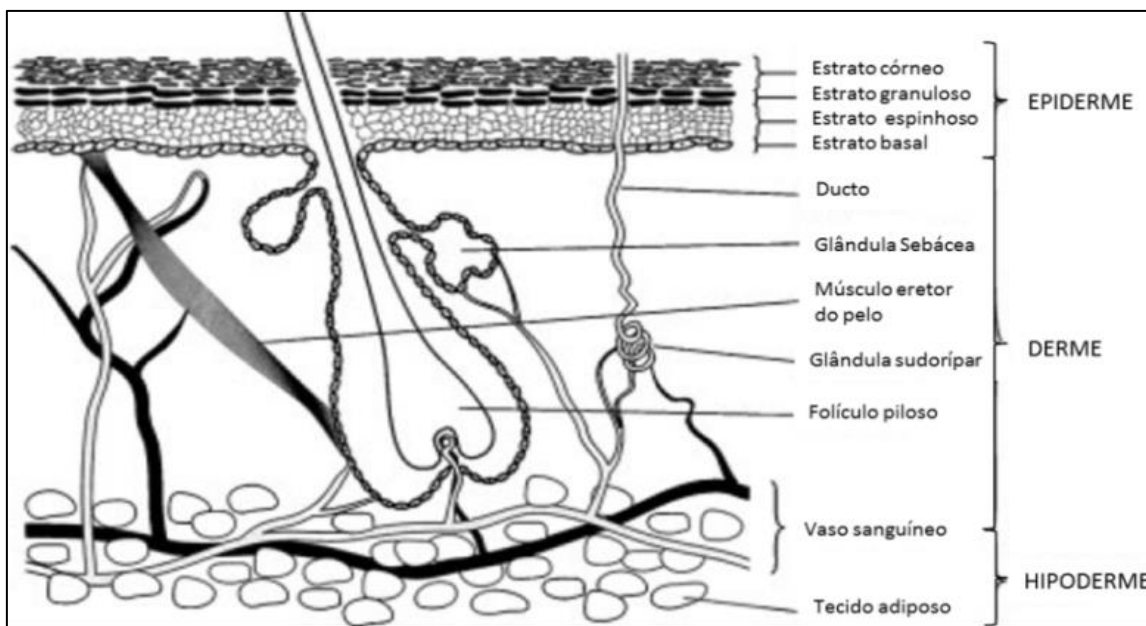


FIGURA 1 – ESTRUTURA MICROSCÓPICA E CAMADAS DA PELE

Fonte: Adaptado de KERMANY (2010)

Uma das principais funções de sua porção mais externa, ou epiderme, é produzir uma escama ou barreira impenetrável de queratina para a proteção contra o ambiente externo. A pele também age como órgão sensorial e nela se verificam com grande precisão os sintomas de dor, tato, calor e frio, alertando o organismo para que elabore uma resposta correspondente (VIGLIOGLIA; RUBIN, 1991). A pele também participa do sistema imunológico e exerce outras funções, como a regulação da temperatura corpórea, a produção de vitamina D₃, a excreção de eletrólitos, dentre outras substâncias, além de proteção relativa contra danos físicos (KEDE; SABATOVICH, 2004; PERSONELLE, 2004).

Quanto à função de proteção química e antibacteriana, a pele é recoberta pelo filme hidrolipídico, que mantém um pH ácido, hidrata a camada córnea e desempenha um papel de defesa contra diferentes agressões (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999).

Devido as suas características, a pele pode ser utilizada como via alternativa para a administração de fármacos, tendo como principais vantagens o conforto ao paciente, extensa área disponível, baixa degradação enzimática, além da minimização de diversos efeitos provenientes das vias oral ou parenteral. Através do tecido cutâneo, são possíveis tratamentos dermatológicos tópicos, aplicação de adesivos transdérmicos ou ainda, proteção e cuidado da pele com o uso de produtos cosméticos (BOLZINGER *et al* 2012; VAZQUEZ; MORENO; SANCHEZ, 2011).

O processo de difusão de ativos através da pele é dividido em três partes: penetração, que é a passagem de uma substância em uma camada específica da pele; permeação, tratada como a penetração através de uma camada para outra; e a absorção, pelo sistema vascular (BOLZINGER *et al* 2012).

Essa passagem (Figura 2) pode ocorrer por entre as células, pela solubilização nos lipídios que constituem a bicamada lipídica, denominada intercelular; pelo interior das células, através dos corneócitos e bicamada lipídica, conhecida como intracelular ou transcelular; ou ainda, pelos apêndices cutâneos como glândulas de suor e folículo piloso, sendo as duas primeiras vias as mais importantes (CONTRI *et.al.*, 2011).

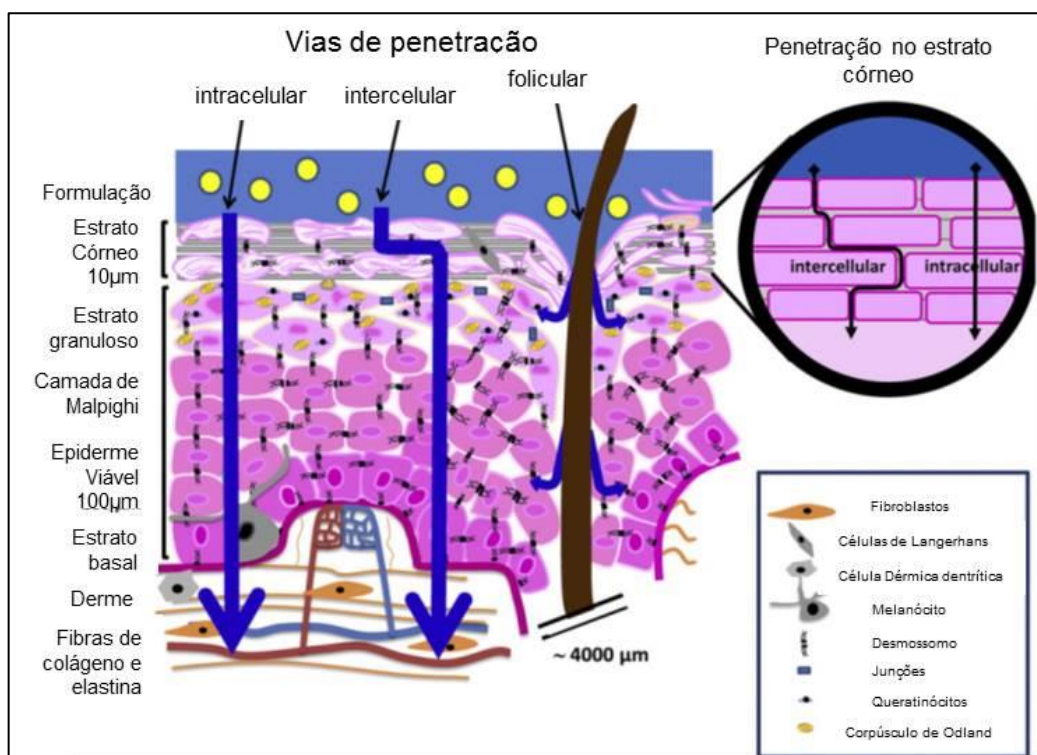


FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA

Fonte: Adaptado de BOLZINGER *et.al.* (2012)

A entrada de um produto no/ou através do tecido cutâneo depende de suas propriedades físico-químicas, massa molecular e lipofilia. Para que esse fenômeno ocorra, é preciso solubilidade tanto em água quanto em óleo, com um valor ótimo de coeficiente de partição octanol-água ($\log P$). Uma baixa absorção ocorre com maior probabilidade quando o $\log P$ é maior que 5 ou menor que -1 e a massa molecular maior que 500 daltons (YAN *et.al.*, 2011). Diversos estudos apontam a retenção de

ativos lipofílicos com altos valores de log P nas camadas da pele; sendo quanto maior o valor de log P, maior a probabilidade do ativo permanecer retido na pele. Para compostos hidrofílicos, sua absorção percutânea é influenciada pelo conteúdo de água na pele (DURACHER *et.al.*, 2009).

3.2 ÓLEOS E GORDURAS

De origem vegetal ou animal, os óleos e gorduras consistem de uma mistura complexa de diversos lipídios, como ácidos graxos, mono, di e triglicerídeos, fosfolipídios e produtos não saponificáveis como pigmentos, hidrocarbonetos como esqualeno, esteróis ou vitaminas lipossolúveis como carotenóides e tocoferóis, antioxidantes naturais contra a rancidez (ROSSAN, 2011).

Os triglicerídeos compõem a porção mais significativa, podendo atingir até 99% do conteúdo dos óleos e ceras, com composição variável conforme a espécie, e uso dependente do tipo e proporção de ácidos graxos. Demais componentes lipídicos em menor proporção podem determinar possíveis atividades cosméticas e farmacêuticas (ROSSAN, 2011).

Os triglicerídeos são lipídios simples, quimicamente ésteres de glicerol com três moléculas de ácidos carboxílicos de cadeia longa, denominados ácidos graxos (Figura 3), que sob hidrólise produzem três moléculas de ácido graxo e uma de glicerol (ROSSAN, 2011).

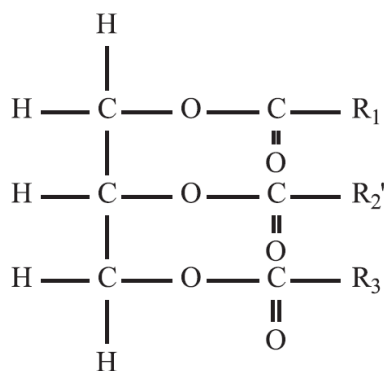


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DE UM TRIGLICERÍDEO

As gorduras podem se apresentar como sólidas ou semi-sólidas a temperatura ambiente, enquanto que os óleos são líquidos sob as mesmas condições. Visto que a composição de ácidos graxos dos triglicerídeos determina as propriedades físico-químicas dos óleos e gorduras, quando relativamente insaturados (com várias ligações duplas ou triplas entre carbonos) apresentam-se como óleo, e quando os ácidos graxos são saturados, com muitas ligações simples entre os carbonos, como gordura (ROSSAN, 2011).

Em formulações cosméticas, os óleos e gorduras são frequentemente utilizados como agentes emolientes e condicionantes (ROSSAN, 2011).

3.2.1 Óleo de Mamona

O óleo de mamona, também conhecido como óleo de rícino, obtido das sementes da mamona, é um líquido transparente, viscoso e incolor muito utilizado na fabricação de cosméticos. É rico em ácidos monoinsaturados e apresenta biodegradabilidade superior a 90% (SCHNEIDER, 2003).

Seu principal constituinte é o triacilglicerol do ácido ricinoléico, denominado triricinoleína. O ácido ricinoléico é um ácido graxo incomum, que apresenta 18 carbonos, com uma insaturação *cis* no C₉ e uma hidroxila no C₁₂. Além do ácido ricinoléico, também são encontrados o ácido esteárico, oleico, linoléico, linolênico, palmítico e segundo alguns autores o diidroxiesteárico (SCHNEIDER, 2003).

3.2.2 Ceras

As ceras podem ser classificadas em naturais ou sintéticas, sendo as primeiras obtidas por meio de insetos, animais, vegetais ou minerais (ROSSAN, 2011; SHAH, 2002).

As ceras de origem vegetal são encontradas como secreções de folhas, caules e frutos, como a cera de carnaúba, extraída das folhas da *Copernicia cerífera*, e a de candelila, das folhas de *Euphorbia cerífera* e *Euphorbia antisiphilitica*. Já

aquelas provenientes de insetos, podem ser obtidas por depósitos em ramos de árvores, como a cera chinesa extraída de insetos da espécie *Coccus ceriferus*, ou durante a construção dos favos de mel, no caso da cera de abelha (ROSSAN, 2011).

Aquelas provenientes de animais podem ser obtidas a partir de animais marinhos, como a de espermacete, extraída do material ceroso presente nas cavidades da cabeça e gordura da baleia da espécie *Physeter macrocephalus*, ou da substância secretada pelas glândulas sebáceas de carneiros, conhecida como cera de lã. As ceras minerais podem derivar do petróleo como a parafina e a microparafina, ou do carvão, como a cera lignita e a cera Utah (ROSSAN, 2011; SHAH, 2002).

Por fim, as ceras sintéticas podem ser obtidas por síntese química, sem relação com as ceras naturais em estrutura química, mas similares a elas em características físicas. Como exemplo, os óleos hidrogenados de origem vegetal ou animal, ácidos e álcoois graxos, cetonas, aminas e amidas de alto peso molecular, ceras cloronaftalênicas obtidas pela reação de cloração de naftaleno, ceras de silicone, entre outras (ROSSAN, 2011).

Quimicamente, as ceras são constituídas por uma mistura complexa de ésteres, hidrocarbonetos de cadeia linear e ramificados, álcoois saturados e insaturados, esteróis, ácidos graxos saturados e insaturados, ácidos dibásicos, mono e di-hidroxi-ácidos, lactonas poliésteres e hidroxí-ésteres de cadeia longa. Nas ceras de origem natural, os ésteres e hidroxí-ésteres são os principais componentes. Diferentemente das gorduras, não possuem triglicerídeos (ROSSAN, 2011; SHAH, 2002).

As ceras, devido ao seu relativo baixo ponto de fusão, são materiais muito interessantes para a preparação de micropartículas através de técnicas de extrusão, dispersão fundida ou através de técnica de solidificação. Uma das principais vantagens da utilização destes materiais e técnicas é o fato de não ser necessário o uso de solventes orgânicos e serem matérias-primas bem conhecidas. Mas, como desvantagem, essa metodologia exige o aquecimento para a fusão das ceras, impedindo assim a utilização de substâncias termo-sensíveis e/ou voláteis (ALMEIDA; MULLER; SOUTO, 2007).

3.2.2.1 Cera de Abelha

Dentre os diversos tipos de ceras destaca-se a cera de abelha, amplamente utilizada pelas indústrias cosmética e farmacêutica em pomadas, loções, cremes faciais e labiais, revestimento de comprimidos, pois, assim como as demais ceras e gorduras, é biocompatível, de baixa toxicidade, de fácil processamento, com alta reprodutibilidade, ausente de solventes orgânicos, quimicamente inerte, de estrutura densa e de baixo custo (ARAVINDARAM *et.al.*, 2012; GIFANI *et al*, 2009; GOWDA *et.al.*, 2010; NUNES *et.al.*, 2012).

Pelas abelhas, a cera de abelha é utilizada na construção dos favos e para armazenamento de alimento, postura e desenvolvimento das crias, participando ainda na composição do própolis (NUNES *et.al.*, 2012).

Quimicamente, a cera de abelha é uma mistura complexa de monoésteres lineares e ramificados saturados e insaturados, hidrocarbonetos, ácidos graxos e álcoois livres e outras substâncias menores exógenas produzidas pelas abelhas. Contém 27 a 40% de monoésteres, distribuídos em ésteres alquila do ácido palmítico e oleico; 9 a 23% de hidroximonoésteres, compostos por ésteres do ácido hidroxipalmítico e diolésteres do ácido palmítico; 7 a 16% diésteres de diois e ésteres de hidroxiácidos acilados; 3,9% hidroxiésteres; 11 a 28% hidrocarbonetos, sendo aproximadamente 12,8% alcanos e 2,9% alcenos; 1 a 18% ácidos graxos livres saturados não ramificados, 4 a 8% de outras substâncias e menos de 0,3% de álcoois graxos livres. Fisicamente, possui ponto de fusão entre 61 a 65°C, sendo insolúvel em água e álcool frio, muito solúvel em éter e clorofórmio, solúvel em benzeno quente e terebentina. A coloração varia de branca a amarelo escuro, dependendo da contaminação com pólen encontrado no mel, partículas de própolis, podendo ainda se tornar escura pelo uso e consequente acúmulo de impurezas, chegando a quase preta pelo fervura excessiva (EFSA, 2007; FNAP, 2009; NUNES *et.al.*, 2012; ZHU *et al*, 2010).

Diversos estudos utilizaram diferentes ceras como material encapsulante para fármacos, como por exemplo, a microencapsulação do propranolol descrito por Varshosaz e Keihanfar (2001); ácido valpróico por Giannola, De Caro e Rizzo (1995); sulfato de salbutamol por Raghuvanshi e colaboradores (1992) e vitamina A para uso tópico por Jennings e colaboradores (2000). Além disso, especificamente

para o ácido salicílico, segundo Varshosaz e Keihanfar (2001), a presença dos ácidos graxos livres como, por exemplo, o ácido cerótico na cera de abelha aumenta a sua afinidade à base livre da droga.

3.3 ÁCIDO SALICÍLICO

Também conhecido como ácido 2-hidroxibenzoico, o ácido salicílico, um β -hidroxiácido, fisicamente um pó cristalino branco, originalmente introduzido para tratamento oral por Rev. Edmund Stone em 1763, encontra-se na forma de éster em diversas plantas como *Cananga odorata* (ylang-ylang), casca de salgueiro, malmequer, cascas de bétula doce entre outras, bactérias, fungos e frutas, tendo sido produzido sinteticamente pela primeira vez em meados de 1800 (AYATOLLAHI *et al.*, 2013; DISALVO, 2002; KARIM *et.al.*, 2006; SCCNFP, 2002).

Apresenta PM 138,12; fórmula molecular $C_7H_6O_3$ (Figura 4) possui um pH de 2,4 em solução saturada em água e sublima a 76°C (PUBCHEM, 2013; YAN *et.al.*, 2011).

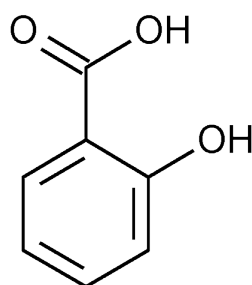


FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO SALICÍLICO

É caracterizado pela presença de três grupos funcionais orgânicos: ácido carboxílico, fenol e um anel aromático (HUMBERT; ALNOT; QUILÈS, 1998).

Não apresenta nenhum polimorfo nem capacidade de solvatação devido à ligação intramolecular do hidrogênio presente na hidroxila com o oxigênio da carbonila. Com isso, a molécula e seus dímeros ficam menos flexíveis, reduzindo sua capacidade de ligação intermolecular (NORDSTRÖM; RASMUSON, 2006).

Sua morfologia de cristalização em água é diferente daquela em solventes orgânicos, pois no segundo caso agulhas são formadas enquanto que no primeiro são tubos ocos peculiares com áreas sequenciais transversais e quadradas (NORDSTRÖM; RASMUSON, 2006).

Referente às suas características físicas, o ácido salicílico é pouco solúvel em água fria (1:460), moderadamente solúvel em água quente (1:15), facilmente solúvel em etanol (1:3), éter (1:3) e acetona (1:3), muito solúvel em acetona, facilmente solúvel em etanol e éter etílico, ligeiramente solúvel em clorofórmio, ligeiramente solúvel em glicerina (1:60), óleo de oliva e amêndoas (1:80), solúvel em óleo de mamona (1:10), em ceras fundidas e vaselina líquida (ANFARMAG, 2001; ANVISA, 2010). Segundo a Associação Européia de Cuidados Pessoais (SCCNFP, 2002), é solúvel em água a 2,17 mg/mL a 20°C.

Segundo Nordström e Rasmuson (2006), sua solubilidade molar diminui nessa ordem: acetona, acetato de etila, metanol, ácido acético, acetonitrila e água, sendo a solubilidade em água muito menor que a dos demais solventes estudados. A alta solubilidade em acetona, acetato de etila e metanol pode estar relacionada com a baixa coesão entre as moléculas de solvente. O metanol é também capaz de fazer ligações de hidrogênio e de acomodar anéis aromáticos do soluto. O ácido acético aparece como o melhor solvente devido à presença de grupos ácidos carboxílicos em ambas as estruturas. Em acetonitrila, a afinidade pelo ácido salicílico é reduzida.

Em se tratando de um ácido, sua solubilidade em água pode ser aumentada pela adição de fosfato de sódio, bórax, acetatos ou citratos básicos (DISALVO, 2002; SCCNFP, 2002) e diminuída pela adição de sais à água de solubilização como cloreto de sódio, cloreto de potássio, brometo de sódio, entre outros, capazes de reduzir a solubilidade do ácido salicílico no intervalo de temperatura entre 20 e 40°C pelo princípio da separação de fases de misturas de água-solvente orgânico induzida por sal (PIRES; FRANCO JUNIOR, 2012).

No que diz respeito ao seu efeito na pele, o ácido salicílico tem como mecanismo de ação a dissolução do cimento intercelular existente entre os corneócitos adjacentes, reduzindo sua coesão, sendo também capaz de difundir-se pela unidade pilossebácea, aumentando a esfoliação das regiões oleosas do rosto. Essa dissolução do estrato córneo pode chegar até a camada granulosa e possivelmente a supra basal, mas sem vacuolização, inchamento ou necrose dessa

última camada. Somado a isso, sua capacidade de aumentar a descamação do estrato córneo faz do ácido salicílico um agente terapêutico muito usado no tratamento da acne (DISALVO, 2002; FLYNN, 2001; KLIGMAN, 2001). Muitos de seus efeitos clínicos como a diminuição da hiperpigmentação e da rugosidade da pele podem ser atribuídos a essa ação superficial que promove a nível celular diversas mitoses e a regeneração de uma nova epiderme abaixo da lesão superficial (KLIGMAN, 2001). Na pele, tem ainda atividade queratolítica, hidratante, condicionante (inclusive para o cabelo), acidulante, anti-acnéica, anti-caspa, antifúngica, anti-inflamatória, fotoprotetora na região do ultravioleta (YAN *et al*, 2011) e anti-pruriginosa (DISALVO, 2002).

A nível sistêmico, o ácido salicílico é capaz de inibir a cicloxigenase 1 e 2, sendo capaz de reduzir a formação de prostaglandinas e tromboxanos provenientes do ácido araquidônico (JOUYBAN; AZAR; KHONSARI, 2011).

Utilizado para o tratamento de verrugas e calos, na forma de bases coloidais (GOI; VERESSININA; TRAPIDO, 2008; RINALDI; CLEMENTE, 1994), no tratamento da psoríase (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008) e hiperqueratoses, sendo aplicado no máximo a 3% como tratamento alternativo para a acne por pessoas intolerantes aos retinóides, ou como tratamento inicial para pequenos comedões (KATSAMBAS; STEFANAKI; CUNLIFFE, 2004; KRAUTHEIM; GOLLNICK, 2004; RAMANATHAN, 2011). Algumas vezes é também incorporado em produtos de cuidado da pele contendo componentes ativos para aumentar a absorção e eficácia dos mesmos. Outros usos incluem conservante de alimentos, matéria-prima para a síntese de corantes e salicilatos (aspirina), antisséptico e antifúngico para aplicação tópica em tratamentos veterinários (SCCNFP, 2002).

Em aplicações cosméticas, o ácido salicílico é considerado seguro a 2% em formulações para permanência na pele (cremes faciais e corporais) e enxaguáveis (removedores de maquiagem, géis de banho, shampoos e condicionadores); a 1% em produtos para permanência no cabelo e como conservante em outros produtos cosméticos a 0,5% (SCCNFP, 2002). Apesar disso, artigos citam o uso de 25-30% em veículo hidroalcoólico como um agente esfoliante químico superficial para a acne e o fotoenvelhecimento leve (KLIGMAN, 2001) ou ainda 0,5-60% com diversas funções (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008).

Desde 1929, as propriedades de penetração do ácido salicílico na pele em diferentes veículos são reportadas, sendo que a entrega do ativo depende não

apenas da sua concentração inicial na base, mas também do tipo de veículo utilizado (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008). Segundo Torriero e colaboradores (2004), seu uso sistêmico pode causar irritações severas, sendo unicamente usado por via externa. Assim, diversos derivados como os ésteres do ácido salicílico, obtidos pela reação do grupo carboxílico com álcool e os ésteres do grupo fenólico do ácido salicílico com ácidos orgânicos foram sintetizados. De modo geral, sua ação é proveniente do conteúdo de ácido salicílico, mas esses ésteres alteram a toxicidade do ácido, reduzindo-a.

Referente aos riscos do ácido salicílico, quando utilizado por via oral, a irritação gastrointestinal é o mais comum (AYATOLLAHI *et.al.*, 2013). Já por via dérmica, algumas dermatites de contato podem se manifestar. Entretanto, seu uso repetitivo pode trazer alguns problemas a nível sistêmico, uma vez que é altamente absorvido pela pele humana e de animais, levando a intoxicação por salicilatos (YAN *et.al.*, 2011), conforme relatado por Jabarah, Gilead e Zlotogorski (1997) em seu estudo de caso de intoxicação pela aplicação tópica de ácido salicílico no tratamento da psoríase. Caso também reportado por Loden (2003), que cita aplicações excessivas de ácido salicílico em altas concentrações (5%), podendo levar a sintomas de intoxicação por salicilatos. Alguns desses sintomas incluem queimação na mucosa oral, dor de cabeça frontal, sintomas no sistema nervoso central, acidose metabólica, zumbido, náuseas, vômitos, e sintomas gástricos, ocorrendo com maior frequência no tratamento tópico para psoríase, em grande extensão do corpo, especialmente em crianças (FLUHR; CAVALLOTTI; BERARDESCA, 2008).

O evento de intoxicação é raro e dependente de vários fatores como idade do paciente, intensidade do dano à pele, concentração do ácido salicílico na formulação e a área de aplicação. Segundo a Associação Européia de Cuidados Pessoais (SCCNFP, 2002) em seu parecer do Comitê Científico dos produtos cosméticos e não alimentares destinados aos consumidores, a respeito do ácido salicílico, pomadas contendo 3 a 6% causaram náusea, dispnéia, perda de audição, confusão e alucinações em três pacientes com psoríase extensa. Os sintomas desenvolveram-se em quatro dias de tratamento com seis aplicações da pomada, combinada a dois banhos diários e terapia ultravioleta. Foram encontrados níveis plasmáticos significativos de ácido salicílico (46 a 64mg/100mL) sendo que os sintomas regrediram rapidamente após a descontinuação das aplicações. Dois casos fatais de intoxicação percutânea causada pelo tratamento de infecção fúngica

com solução alcoólica a 20% de ácido salicílico também foram relatados, onde os sintomas ocorreram a um nível plasmático de ácido de 35mg/100ml de plasma, com maior susceptibilidade em crianças. Apesar disso, a correlação entre a severidade clínica e o nível de salicilatos no corpo humano é ainda escassa, podendo estar associada à variabilidade das proteínas de ligação e pH sanguíneo. Muitas manifestações estão ligadas com doenças de pele, múltiplas aplicações em extensas áreas do corpo e formulações contendo altas concentrações de ácido salicílico (SCCNFP, 2002).

No que diz respeito à irritação dérmica, o ácido salicílico é caracterizado como levemente irritante em formulações a 2%, entretanto sem relatos de sensibilização dérmica. Quanto à teratogenicidade, em modelos animais, o ácido salicílico foi capaz de causar, quando administrado por via oral, malformações fetais podendo chegar à morte perinatal. Ainda segundo a Associação Européia, a rápida absorção do ácido salicílico quando aplicado sobre a pele é dependente da composição do veículo, pH, estrutura da pele e condições de aplicação (uma ou repetidas doses, oclusão). Sua absorção por aplicação tópica pode chegar a 20% da concentração inicial de ácido salicílico em um produto a 2% de ativo (SCCNFP, 2002).

Essa rápida permeação percutânea do ácido salicílico se dá pelas suas características de log P de 2,06 e um PM 138,12 (YAN *et.al.*, 2011).

3.4 TENSOATIVOS

Também denominados surfactantes, os tensoativos são moléculas anfipáticas constituídas por uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica (DALTIM, 2011; ROSSAN, 2011).

Tem como estrutura típica R-X, onde R é a cadeia de hidrocarboneto entre 8 e 18 átomos (linear, ramificada ou com porções cíclicas), e X é o grupo cabeça, polar, que dará a classificação dos tensoativos em não-iônico, catiônico, aniônico ou anfótero (DALTIM, 2011; ROSSAN, 2011).

Visto que possuem na mesma molécula grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, tendem a se distribuir nas interfaces com diferentes graus de polaridade. A formação

de um filme molecular ordenado nas interfaces reduz assim a tensão interfacial e superficial, caracterizando suas propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, molhante, solubilização e dispersão de fases (ROSSAN, 2011).

A medida da afinidade de um tensoativo para óleo ou água é identificada pelo sistema EHL ou Equilíbrio Hidrofílico-Lipofílico, proveniente de um valor calculado ou estimado experimentalmente. Para cada emulsificante há um valor numérico que expressa a relação entre o grupo hidrofílico e lipofílico. Assim, um tensoativo de caráter lipofílico apresentará valores de EHL baixos (abaixo de 9,0), adequando-se a emulsões do tipo água em óleo, enquanto que tensoativos hidrofílicos, com EHL alto (acima de 11,0), tenderão a emulsões óleo em água (DALVIN, 2011; ROSSAN, 2011).

3.5 MICROENCAPSULAÇÃO

As substâncias ativas pretendidas para uso dermatológico podem ser incorporadas diretamente em uma base galênica como cremes, loções, pomadas, géis e soluções ou ainda, encapsuladas em sistemas de liberação modificada como micro e nanopartículas, lipossomas, entre outros (ROSSAN, 2011).

O conceito de encapsulação surgiu da idealização do modelo celular, onde um material interno, denominado núcleo, é recoberto por um material de cobertura. O núcleo pode ser uma partícula sólida ou uma gota de um líquido, dispersão ou emulsão. Essa membrana se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância de forma controlada e sob condições específicas (CHAN; LIM; HENG, 2000; JYOTHI *et.al.*, 2010).

Algumas razões para o uso dessa tecnologia incluem a proteção contra a oxidação e fotossensibilidade, separação de incompatibilidades, conversão de líquidos em sólidos, redução das propriedades de volatilidade e inflamabilidade, facilidade de manuseio, mascaramento de sabores e odores desagradáveis do material encapsulado, liberação modificada com máximo efeito terapêutico e baixo risco de efeitos adversos pela menor dose aplicada, diminuição da degradação e consequente aumento da estabilidade, entre outras (CHAN; LIM; HENG, 2000;

CALERO *et.al.*, 2008; GOWDA; SHIVAKUMAR, 2007; JYOTHI *et.al.*, 2010; MAGILL, 1991; PONCELET, 2006; ROSSAN, 2011).

As micropartículas podem ser divididas em microesferas e microcápsulas (Figura 5) conforme a sua estrutura. As partículas compactas constituídas por uma matriz polimérica na qual a substância ativa encontra-se distribuída uniformemente no seu estado sólido ou molecular são denominadas microesferas. Já nas microcápsulas, um núcleo interno contendo o agente ativo é recoberto por uma camada de polímero ou outro material de espessura variável (ROSSAN, 2011; LACERDA, 2009).

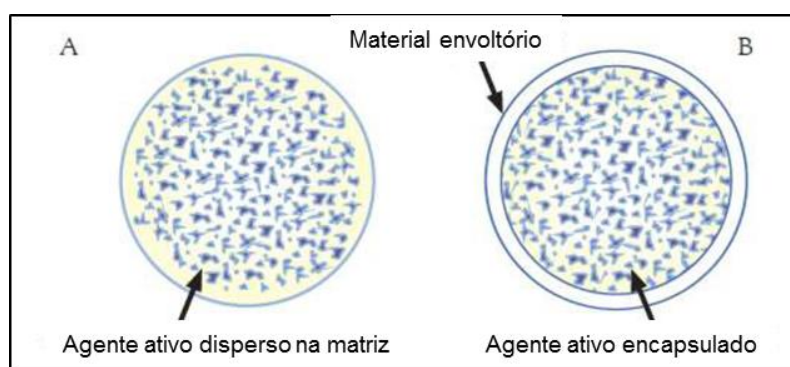


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS MICROPARTÍCULAS: (A) MICROESFERA E (B) MICROCÁPSULA

Fonte: Adaptado de Suave *et al* (2006)

As micropartículas apresentam tamanho habitual compreendido entre 3 a 800 μm , sendo denominadas de nanopartículas quando menores que 1 μm ou de macropartículas, se maiores que 1000 μm (JYOTHI *et.al.*, 2010).

Diversos métodos podem ser utilizados para a obtenção de microcápsulas como polimerização, gelificação, coacervação, coalescência, solidificação ou ainda evaporação (PONCELET, 2006). Atualmente, a mais utilizada comercialmente é o *spray-drying* para a encapsulação de óleos, com carboidratos, proteínas e gomas como material encapsulante (CHAN, 2011).

A escolha do método mais adequado depende do tipo do material ativo, tamanho de partícula requerido, propriedades físicas e químicas do encapsulante e encapsulado, aplicação do produto final, mecanismo de liberação desejado para a sua ação, escala de produção e custo. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do ativo pelo agente

encapsulante, que pode ser de natureza física, química ou físico-química (JYOTHI *et.al.*, 2010; SUAVE *et al*, 2006; ROSSAN, 2011).

Quanto aos materiais de encapsulamento, sua seleção depende de vários fatores como a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo a ser utilizado para a formação da partícula e o mecanismo de liberação do ativo. Alguns exemplos incluem etilcelulose, hidroxipropilcelulose, alginato de sódio, poli (ácido láctico-co-ácido-glicólico), gelatina, poliésteres, quitosana, ceras, entre outros, que podem revestir diversos ativos farmacêuticos, proteínas, peptídeos, óleos voláteis, alimentos, pigmentos, corantes, catalisadores, pesticidas, entre outros (JYOTHI *et.al.*, 2010; ROSSAN, 2011; LACERDA, 2009).

No que se refere ao mecanismo de liberação do material ativo encapsulado, dependente da natureza do agente encapsulante, pode ocorrer por diferentes mecanismos como variação de temperatura e pH, solubilidade do meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente. Ainda pode ocorrer de maneira contínua (liberação sustentada) ou abrupta (imediate) (ROSSAN, 2011; LACERDA, 2009).

Geralmente, uma liberação imediata se dá em sistemas do tipo reservatório, onde a membrana pouco permeável liberará abruptamente seu conteúdo após seu rompimento. Já os sistemas de liberação contínua são majoritariamente matriciais. A liberação da substância ocorre por difusão através da matriz por erosão, degradação, dissolução ou permeabilidade seletiva da matriz ou uma associação desses mecanismos (LACERDA, 2009).

3.5.1 Sistemas lipídicos

As ceras e outros materiais lipídicos sólidos relacionados formam matrizes, que dispersam ou dissolvem um ativo e promovem o retardo de sua liberação. Os sistemas matriciais encontram-se classificados de acordo com a sua natureza química e mecanismo de liberação. Assim, podemos ter matrizes hidrófilas ou hidrófobas, sendo que essas últimas englobam as matrizes inertes e lipídicas (LIBERAL, 2008).

As matrizes lipídicas são constituídas por um lipídio sólido no qual o ativo está uniformemente disperso. Essas matrizes são divididas em ceras (cera microcristalina, cera de carnaúba, cera de abelha), triglicerídeos (óleo de rícino hidrogenado), ácidos graxos (ácido esteárico, ácido palmítico), álcoois graxos (álcool cetílico) e ésteres diversos (monoestearato de propilenoglicol). A difusão do ativo ocorre através de poros existentes no esqueleto lipídico, formados após penetração do líquido de dissolução na matriz (ALMEIDA; MULLER; SOUTO, 2007).

As partículas lipídicas sólidas derivam das emulsões óleo em água, pela simples troca do lipídio líquido (óleo) pelo sólido ou misturas de lipídios sólidos à temperatura ambiente (ROSSAN, 2011; MÜLLER; RADTKE; WISSING, 2002).

As nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) foram desenvolvidas em 1991, como um método alternativo a encapsulação de princípios ativos em relação aos sistemas coloidais tradicionais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas. Seu grande diferencial está na sua excelente estabilidade físico-química, proporcionando maior proteção contra a degradação de fármacos lábeis. Na área farmacêutica, essas partículas podem ser utilizadas por todas as vias de administração como oral, parenteral e cutânea pelo seu tamanho reduzido, que varia de 50 a 1000nm e pela sua biocompatibilidade (SOUTO *et.al.*, 2011).

Diferentes métodos de produção de NLS permitem incorporar ativos hidrossolúveis e lipossolúveis. Entretanto, devido à natureza lipídica da matriz, são particularmente adequadas a veiculação de ativos apolares, onde evidenciam uma capacidade de carga elevada. A preparação das NLS pode ser realizada por fusão-emulsificação, por emulsificação-evaporação do solvente, ou a partir de microemulsões (SOUTO *et.al.*, 2011).

A primeira etapa de formação de micropartículas lipídicas pelo processo de fusão-emulsificação ocorre com a fusão do lipídio para incorporação do fármaco em sua estrutura, seguida de resfriamento para originar as partículas. Durante esse processo de solidificação, a viscosidade do lipídio fundido aumenta progressivamente, dificultando a acomodação das moléculas lipídicas, originando por fim cristais lipídicos com diferentes graus de organização tridimensional, ou seja, com diferentes formas polimórficas. Esse fenômeno é conhecido como recristalização do lipídio, sendo que o grau de cristalinidade das micropartículas recém-formadas dependerá da organização tridimensional das cadeias hidrocarbonadas das moléculas na matriz lipídica solidificada (SOUTO *et.al.*, 2011).

Quando comparadas a outros tipos de partículas, apresentam como vantagem a inocuidade de seus constituintes, matérias-primas biocompatíveis, processo rápido e efetivo de produção, possibilidade de evitar o uso de solventes orgânicos, entre outras (MULLER *et.al.*, 2002; LIM; KIM, 2002).

3.5.1.1 Polimorfismo Lipídico

O polimorfismo cristalino é definido como a capacidade de uma substância orgânica ou mineral de existir sob diferentes estruturas cristalinas, que provem de uma variedade de conformações e arranjos moleculares possíveis, sendo uma das mais importantes vias de degradação física que afeta a estabilidade de um material cristalino. Apesar dos polimorfos serem quimicamente idênticos, geralmente apresentam propriedades termodinâmicas diferentes como temperatura de fusão ou solubilidade (LACERDA, 2009; ROSSAN, 2011).

Os lipídios podem apresentar polimorfismo, ou seja, se cristalizar de diferentes formas, criando estruturas distintas, modificando assim a liberação do princípio ativo encapsulado. Essas formas polimórficas podem ser identificadas por padrões de Difração de Raio X, onde, segundo Souto e colaboradores (2011) espaçamentos longos fornecem informações sobre a distância entre os cristais planos (comprimento de cadeia), enquanto os espaçamentos curtos informam sobre a estrutura da sub-célula (distância entre cadeias).

A estrutura polimórfica tem influência direta na eficiência de microencapsulação e expulsão do ativo durante o processo de estocagem, sendo muito importante seu controle e caracterização. As formas polimórficas diferenciam-se em função de sua estrutura subcelular e estrutura em camadas. A primeira refere-se ao modo como a cadeia hidrocarbonada está empacotada, enquanto que a segunda surge pela sequência repetitiva de rede acil, que forma uma unidade lamelar ao longo do eixo de cadeia hidrocarbonada. A cristalização dos lipídios pode ocorrer em estruturas tridimensionais denominadas α , β e β' , conforme a Tabela 1 (JENNING; THÜNNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; RODRIGUES-RACT *et.al.*, 2010).

TABELA 1 - ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DAS TRÊS FORMAS MAIS COMUNS DE POLIMORFISMO EM TRIACILGLICERÓIS

Modificações	α	β'	β
cristal	Hexagonal (H)	Ortorrômica perpendicular (O \perp)	Triclínica paralela (T//)
subcélulas	Ortorrômica 0,415-0,42nm	Ortorrômica 0,42-0,43 nm 0,37-0,40 nm	Triclínica 0,46 nm

Fonte: Souto *et.al.* (2011)

A forma α (hexagonal) é a menos estável, mas cineticamente favorável, com menor ponto de fusão e calor latente. Tem temperatura de fusão mais baixa que as demais e caracteriza-se por um sistema cristalino hexagonal com um eixo de rotação senário (eixo de ordem seis) e 27 grupos espaciais. Neste sistema todos os cristais possuem um eixo ternário ou senário de simetria. Possuem quatro eixos cristalográficos, sendo três horizontais, com comprimentos iguais e cruzando-se em ângulos de 120°, e o quarto vertical, com comprimento diferente dos demais. Por vezes é considerado como mera variante do sistema trigonal (por duplicação). O empacotamento hexagonal não demonstra orientação específica das cadeias. Ao contrário, elas estão submetidas a grande movimento torsional com uma conformação alifática, fazendo essa subcélula ser a menos estável quando comparada as demais. A morfologia cristalina é amorfa (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; RODRIGUES-RACCT *et.al.*, 2010).

A forma β é termodinamicamente estável e possui maior ponto de fusão, consistência e calor latente. Seu sistema cristalino é caracterizado como triclínico, exibindo apenas simetria translacional ou inversão. Permite apenas dois grupos espaciais. Os cristais com este sistema caracterizam-se pela ausência de eixos ou planos de simetria e apresentam três eixos cristalográficos com comprimentos desiguais e oblíquos entre si. Sua morfologia cristalina tem formato de agulhas (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; RODRIGUES-RACCT *et.al.*, 2010).

A forma β' é uma forma de estabilidade intermediária que funde a uma temperatura maior do que a forma α . Seu sistema cristalino é ortorrômico e caracterizado por três eixos binários de rotação ou um eixo de rotação binário e dois

planos de imagem reflexa. Permite 59 grupos espaciais. Gera estruturas de grande complexidade tendo ao menos um eixo binário de simetria comum a todos os cristais deste sistema. Possui três eixos cristalográficos perpendiculares entre si, todos com comprimentos diferentes. Sua morfologia cristalina é caracterizada por minúsculas partículas (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; SILVA; ESCOBEDO, GIOIELLI, 2008).

Dependendo da composição em ácidos graxos dos triacilgliceróis formas polimórficas metaestáveis chamadas γ e δ podem ainda ser encontradas, bem como subformas de β e β' . De modo geral, lipídios de composição homogênea tendem a apresentar a forma β , mais densamente empacotada, enquanto que lipídios de composição heterogênea tendem a apresentar a forma β' (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000).

As formas α e β' recristalizam na forma termodinamicamente estável β sendo que as transformações de α para β' (ortorrômbica) e dessa para β ocorrem nesta ordem e são irreversíveis, exceto por fusão e recristalização (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; SANTOS *et.al.*, 2009; SOUTO *et.al.*, 2011; SILVA; ESCOBEDO, GIOIELLI, 2008).

De modo geral, essa transformação é mais lenta para triglicerídeos de cadeia longa do que para aqueles de cadeia curta, tendo como fatores promotores da transformação de α para β a temperatura, exposição à luz e perda de água de dispersão das partículas lipídicas sólidas. Como exemplo, quando as partículas são aplicadas à pele ou no corpo humano, a alteração de temperatura e perda de água da dispersão inicia a transformação da forma α para β com consequente liberação do ativo das partículas. Esse controle do ativador da transformação promove a criação de carreadores de ativo inteligentes (MARCATO, 2009).

Glicerídeos cristalizam em diferentes arranjos e exibem polimorfismo com três ou mais formas, enquanto que esse fenômeno em ceras é drasticamente reduzido, prevalecendo a forma ortorrômbica e a velocidade de transição polimórfica lenta (ROSSAN, 2011).

Em uma substância sólida, os estados polimórficos possuem diferentes propriedades físicas que, após fusão resultam em líquidos idênticos, desde que os diferentes estados sejam unicamente das diferenças de empacotamento das cadeias carbônicas presentes nas moléculas dos triglicerídeos na cristalização (SANTOS *et.al.*, 2009).

Essa cristalização polimórfica é determinada, primordialmente, pela taxa de nucleação, governada por fatores termodinâmicos e cinéticos. Segundo Mutaftschiev (1993), a primeira referência à nucleação polimórfica foi dada pela “Regra de Ostwald” a qual prediz que a mudança de fase ocorrerá passo a passo, sucessivamente em direção à maior estabilidade das fases (SANTOS *et.al.*, 2009).

O processo de cristalização é dividido em duas fases: nucleação e crescimento dos cristais. Durante a primeira fase, o crescimento da rede sólida inicia-se com sítios de nucleação, que crescem formando cristais maiores quando moléculas adicionais de triacilgliceróis cristalizam-se. Esses cristais maiores formam elementos microestruturais de 10 μm aproximadamente, que se agregam em grupos maiores para formar as chamadas microestruturas, de 100 μm ou mais. O empacotamento desses grupos é regular e homogêneo, formando os blocos estruturais da rede cristalina dos lipídios. Entre os elementos micro e macroestruturais está a fase líquida da rede. Ao aplicar uma tensão, as ligações entre as microestruturas tem maior probabilidade de serem rompidas que os elementos microestruturais internos (RODRIGUES-RACT *et.al.*, 2010; SILVA; ESCOBEDO; GIOIELLI, 2008).

Uma vez o núcleo formado, este começa a crescer pela incorporação de outras moléculas, no cristal em crescimento. A velocidade de crescimento é diretamente proporcional ao superesfriamento e inversamente proporcional à viscosidade da solução. Ou seja, quanto mais alta a viscosidade, mais difícil a troca de matéria entre a fase líquida e a superfície do cristal, sendo mais lento o seu crescimento. Grandes cristais observados no processo de cristalização são provenientes da união de pequenos cristais por ligações fracas. A morfologia dos cristais é determinada por condições internas e externas, sendo a cinética de cristalização dependente da velocidade de formação do núcleo, bem como da velocidade de crescimento dos cristais. Geralmente, resfriamento lento resulta em cristais grandes e resfriamento rápido em cristais menores (SILVA; ESCOBEDO, GIOIELLI, 2008; RODRIGUES-RACT *et.al.*, 2010).

Durante o processo de fabricação das partículas, as moléculas de ativo são dissolvidas ou dispersas na fase lipídica fundida. Após o resfriamento, se a recristalização ocorrer sob a forma pouco estável e ordenada dos lipídios (α), as moléculas irão preferencialmente se localizar nas zonas amorfas, ou seja, naquelas menos organizadas na matriz cristalina. Já, se o rearranjo cristalino conduzir a forma

mais estável β , esse aumento na organização da estrutura lipídica resultará em redução das regiões desorganizadas, levando a expulsão do ativo encapsulado. Esse último fenômeno ocorre também em matrizes lipídicas compostas por apenas um tipo de lipídio, levando a formação de cristais perfeitamente ordenados, com poucos defeitos (LACERDA, 2009).

A organização tridimensional da matriz lipídica durante o processo de resfriamento é dependente da velocidade com que isso ocorre e de sua composição. Quando a velocidade é lenta, as cadeias hidrocarbonadas dos lipídios podem se rearranjar numa forma mais ordenada e estável. Já com uma velocidade de resfriamento elevada a solidificação da matriz ocorre rapidamente, rearranjando-se numa forma polimórfica mais instável. Quanto à composição lipídica, as matrizes contendo um conteúdo elevado de diacilgliceróis (superior a 50%) cristalizam na forma polimórfica metaestável β' , caracterizada por alguma imperfeição na estrutura tridimensional. As matrizes formadas por triacilgliceróis, esterificados com um único tipo de ácido graxo cristalizam, na maioria das vezes, na forma mais estável β , caracterizada por um elevado grau de organização. Ainda, são encontradas formas polimórficas referidas como β_i , quando da mistura de acilgliceróis (SOUTO *et.al.*, 2011).

Assim, a estabilidade termodinâmica das partículas e seu grau de empacotamento lipídico aumentam, enquanto a incorporação do princípio ativo diminui na ordem forma polimórfica α , β' e β . Portanto, as moléculas lipídicas apresentarão maior mobilidade quando nas configurações termodinamicamente mais instáveis, como a α , tendo configurações com grau de empacotamento lipídico menor e conseqüentemente maior incorporação do princípio ativo (SOUTO *et.al.*, 2011).

É importante lembrar que as transformações polimórficas podem ocorrer durante o armazenamento, gerando instabilidade da dispersão coloidal, visto estarem associadas ao aumento do tamanho das partículas lipídicas. Além disso, essas transformações são acompanhadas por alterações na forma das partículas, de esféricas (α) para achatadas (β), pois uma estrutura pouco organizada pode evoluir ao longo do tempo para uma forma mais estável, com melhor organização, levando a perda da esfericidade e ainda aparição de cristais sob a forma de plaquetas na sua superfície (SOUTO *et.al.*, 2011; LACERDA, 2009).

Entretanto, apenas a manipulação das formas polimórficas não é suficiente para o controle das modificações do lipídio devendo-se considerar que a complexidade do sistema aumenta devido às subespécies polimórficas e às interações do lipídio com os agentes tensoativos. Dessa forma, estratégias devem ser propostas para prevenir a transformação das formas instáveis naquelas mais estáveis durante o armazenamento (SOUTO *et.al.*, 2011).

3.5.1.2 Natureza e concentração do lipídio

O comportamento de cristalização de lipídios tem importantes implicações principalmente no processamento industrial de produtos que tem suas características físicas dependentes de sua estrutura cristalina. Dessa forma, a velocidade de formação dos cristais, o crescimento e as transformações polimórficas são importantes para a determinação do processo e condições de armazenamento de óleos e gorduras (RODRIGUES-RACCT *et.al.*, 2010).

No preparo de partículas lipídicas sólidas, os lipídios utilizados são em sua maioria misturas de vários compostos químicos. De extrema importância, a natureza química dos lipídios selecionados para formação das partículas lipídicas sólidas e sua concentração influenciam a incorporação dos princípios ativos e tamanho das partículas formadas. Lipídios que originam partículas altamente cristalinas como triacilgliceróis constituídos por um ácido graxo originam estruturas organizadas, com poucos espaços para acomodação do princípio ativo, levando a sua expulsão da matriz lipídica sólida. Já misturas de mono, di e triacilgliceróis e misturas de diferentes ácidos graxos, ou seja, lipídios de composição mais complexa resultam em cristais com muitas imperfeições, favorecendo a acomodação de moléculas de ativo. Dessa forma, misturas de acilgliceróis proporcionam maior capacidade de incorporação que lipídios puros (LACERDA, 2009; WISSING; KAYSER; MULLER, 2004).

Segundo Souto e colaboradores (2011), na obtenção de nanopartículas lipídicas sólidas com operação complementar de homogeneização à alta pressão, com o aumento da concentração lipídica, há um aumento na viscosidade da “pré-emulsão” e assim, um aumento na dimensão das partículas formadas, visto se tornar

mais difícil o processo de emulsificação na fase aquosa. Em emulsões com 5 a 10% (m/m) de lipídio, a viscosidade é suficientemente reduzida para a homogeneização a alta pressão, obtendo-se partículas com dimensões reduzidas e distribuição de tamanho homogênea. Já naquelas com mais de 10% de lipídio, as dimensões são maiores e com uma distribuição mais heterogênea de tamanho.

3.5.1.3 Natureza e concentração do tensoativo

A seleção e concentração do tensoativo são fatores que influenciam diretamente as características das partículas lipídicas sólidas, designando suas dimensões, retenção do princípio ativo e eficiência de encapsulação. Altas concentrações de tensoativo reduzem a tensão interfacial, aumentando a área de superfície e, conseqüentemente, reduzindo o tamanho das partículas formadas. Entretanto, quando a fase aquosa externa contém excesso de moléculas de tensoativo, outras espécies coloidais podem ser formadas, como os lipossomas, que podem incorporar moléculas de ativo, diminuindo a eficiência de encapsulação (SOUTO *et.al.*, 2011).

3.5.1.4 Solubilidade do princípio ativo

O princípio ativo pode ser incorporado por meio de dispersão ou dissolução no lipídio fundido, sendo que sua difusão para a fase externa aquosa é acentuada pela sua maior hidrossolubilidade, elevação da temperatura da fase aquosa e concentração do tensoativo na mesma fase (SOUTO *et.al.*, 2011).

Durante o preparo a quente de partículas lipídicas sólidas, o princípio ativo encontra-se dissolvido no lipídio fundido, numa concentração próxima a sua saturação, observando-se sua difusão na fase externa aquosa. Após a homogeneização, uma região de sobressaturação do ativo à volta da gotícula recém-formada de lipídio fundido é criada. Quando do resfriamento do sistema, a solubilidade do princípio ativo na fase aquosa diminui, sendo, em conseqüência,

redistribuído na superfície da partícula, antes do lipídio recristalizar totalmente. Dessa forma, formam-se partículas constituídas por um núcleo lipídico revestido por uma parede contendo ativo (SOUTO *et.al.*, 2011).

Para um ativo hidrofóbico, há uma menor tendência ao abandono do lipídio fundido, com difusão para a fase externa aquosa, levando a uma maior eficiência de encapsulação e carregamento mais elevado. O contrário ocorre para princípios ativos hidrofílicos. Para esses, deve-se promover um aumento de sua solubilidade no lipídio fundido, por conjugação com pares iônicos, ou adicionando-se um tensoativo, ou ainda recorrendo-se a lipídios com propriedades solubilizantes (como os mono e diacilgliceróis) para formação da matriz lipídica sólida (SOUTO *et.al.*, 2011).

3.5.1.5 Temperatura e volume da solução aquosa

As micropartículas são formadas pelo contato rápido entre a emulsão aquecida e a solução aquosa resfriada, sendo a diferença de temperatura entre as fases e o volume de solução aquosa parâmetros que afetam a dimensão das partículas formadas. Uma diferença elevada facilita a recristalização rápida do lipídio e previne a agregação das partículas recém formadas. Assim, partículas com dimensões menores são obtidas. Um volume maior de solução aquosa resfriada diminui o risco de agregação das partículas, enquanto que um volume menor poderá não ser suficiente para dispersar a totalidade da microemulsão, obtendo-se partículas de maior tamanho. Quanto à agitação, a diluição da microemulsão óleo em água numa solução aquosa resfriada ocorre sob agitação mecânica (SOUTO *et.al.*, 2011).

3.5.1.6 Classificação das partículas lipídicas

As partículas formadas a partir de lipídios podem ser classificadas em três diferentes estruturas: nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreadores lipídicos

nanoestruturados (CLN) e conjugados fármaco-lipídio (CFL). As primeiras são formadas por lipídios sólidos a temperatura ambiente e corporal, e estabilizadas por tensoativos. Os lipídios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, misturas de glicerídeos ou ceras. A desvantagem dessa estrutura está na sua baixa capacidade de encapsulamento, que varia entre 25-50%, dependendo da solubilidade do ativo na matriz lipídica, do método utilizado e do estado polimórfico da matriz lipídica. A utilização de lipídios muito semelhantes resulta em cristais perfeitos. Visto que o fármaco se localizará entre as cadeias lipídicas e nas imperfeições dos cristais, a alta organização dos mesmos diminui a eficiência de encapsulamento (Figura 6A). Assim, para minimizar esse efeito são utilizados lipídios mais complexos como mono-di-triglicerídeos. No entanto, o ativo ainda pode ser expulso da partícula após a transição polimórfica da forma α para a modificação mais estável β , processo que pode ocorrer durante a estocagem da dispersão, conforme exemplificado na Figura 6B (MARCATO, 2009; ROSSAN, 2011; LACERDA, 2009).

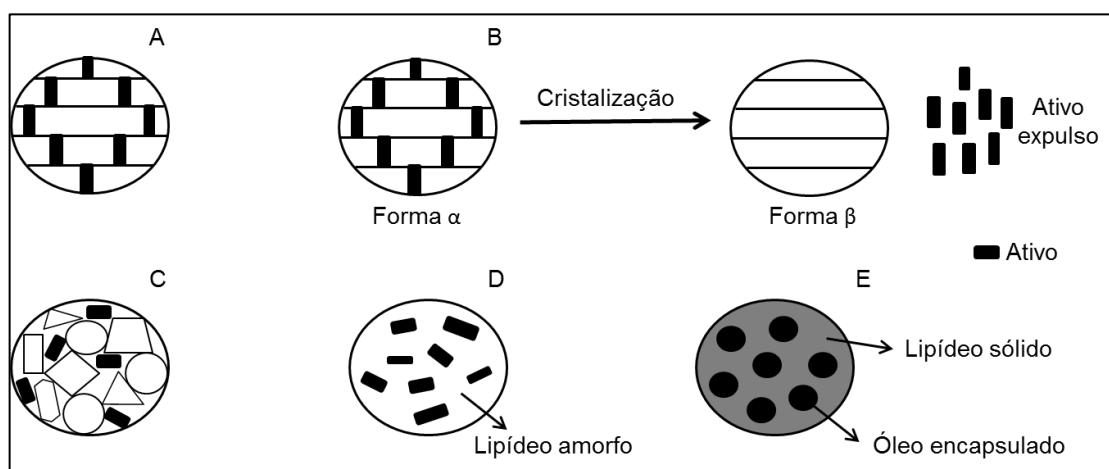


FIGURA 6 – CLASSIFICAÇÃO DAS PARTÍCULAS LIPÍDICAS (Em a) NLS, b) modelo de liberação de ativo durante a estocagem controlada pela transformação da forma α para β , c) CLN imperfeito, d) CLN amorfo, e) múltiplo CLN)

Fonte: Adaptado de Marcato (2009)

Dessa forma, a fim de minimizar esse efeito, surgiram os CLN, com 3 diferentes estruturas. O primeiro modelo, conhecido como CLN imperfeito, consiste na mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, mistura tal que aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos, levando a imperfeições no cristal. Essas imperfeições geram mais espaços para acomodar o ativo, aumentando assim a eficiência de encapsulação. O segundo modelo,

conhecido como CLN amorfo, é composto pela mistura de lipídios sólidos e líquidos (óleos), onde a quantidade de óleo misturado com o lipídio sólido gera partículas em um estado sólido amorfo. Com isso, evita-se a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, visto que o processo de cristalização do lipídio para a forma β não ocorre. Por fim, o terceiro modelo, chamado de múltiplo CLN é considerado análogo a emulsão água em óleo em água, ou seja, é uma dispersão de óleo em lipídio sólido em água. Neste, a solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de compartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida (MARCATO, 2009; ROSSAN, 2011).

Há várias metodologias disponíveis para a produção de micropartículas lipídicas, de alta e baixa energia, com destaque para a tecnologia de *spray-drying*, método de dupla emulsão-evaporação de solvente, método de microencapsulação por emulsão/solidificação, divisão mecânica, fluido supercrítico, atomização e atomização modificada, leito fluidizado e extrusão (ALMEIDA; MULLER; SOUTO, 2007; ROSSAN, 2011).

Os ingredientes utilizados na preparação das NLS, CLN e CFL incluem lipídios como triglicerídeos, ácidos graxos, esteroides e ceras e tensoativos, de diversas classes, para estabilização da dispersão e água (ROSSAN, 2011).

3.5.1.7 Aplicações das partículas lipídicas sólidas

Produtos lipídicos como lipossomas, micro e nanoemulsões, partículas sólidas micro e nanolipídicas são amplamente empregados em preparações para uso dermatológico, farmacêutico e cosmético, pois os materiais lipídicos são facilmente caracterizáveis e podem ser utilizados por diversas vias de administração. Além disso, apresentam biocompatibilidade, baixa irritabilidade cutânea e toxicidade crônica não significativa. Assim, as partículas lipídicas sólidas podem ser utilizadas para liberação de substâncias ativas para vários órgãos e tecidos, tendo potencial para aplicação em administração via oral, pulmonar, parenteral, ocular, transdérmica e também como adjuvantes em vacinas. No tratamento tópico de doenças de pele, tem a vantagem de que altos níveis de ativo podem atingir o local a ser tratado, com redução dos efeitos sistêmicos quando comparada a via oral e parenteral

(ALMEIDA; MULLER; SOUTO, 2007; GOWDA; SHIVAKUMAR, 2007; ROSSAN, 2011).

As nanopartículas baseadas em sistemas lipídicos são o tipo mais comum de partícula estudada para aplicação tópica. Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados compõem os sistemas matriciais enquanto que os lipossomas são o principal tipo de partículas vesiculares avaliadas em estudos de permeação (BECK, GUTERRES, POHLMANN, 2011).

Ao contrário das nanopartículas poliméricas, as lipídicas são menos estáveis quando aplicadas sobre a superfície da pele. Após aplicação tópica, as NLS perdem seu formato e se dissolvem devido à interação entre os componentes da partícula e os lipídios da pele. Isso pode reduzir a função barreira da pele, ocluindo a superfície, favorecendo a permeação cutânea (BECK, GUTERRES, POHLMANN, 2011).

Mas, estudos relatam que o encapsulamento pode também reduzir a permeação de um ativo. Isso pode ser atribuído a provável rigidez da nanopartícula, dependente da composição lipídica da matriz, e a associação entre o ativo e as partículas vesiculares. Interações entre a substância ativa e os componentes da nanopartícula, formação de película pela evaporação de água e uma possível aderência significativa ao estrato córneo observado em sistemas matriciais lipídicos podem ser capazes de reduzir a taxa de liberação do ativo e sua consequente permeação (BECK, GUTERRES, POHLMANN, 2011).

3.5.1.8 Método de microencapsulação por emulsificação/solidificação

O processo de obtenção de micropartículas lipídicas sólidas consiste no processo rotineiro para formação de emulsões óleo em água, porém utilizando parte da água do processo resfriada à aproximadamente 8°C. Com esta condição, as gotículas da fase interna da emulsão solidificam e são posteriormente separadas dos demais componentes do sistema por centrifugação ou filtração. Após a secagem das partículas no meio ambiente, elas passam a ter comportamento de pó.

A emulsificação/solidificação consiste na dispersão do fármaco no excipiente fundido, seguida da emulsificação dessa fase com uma fase aquosa contendo um tensoativo, aquecida à mesma temperatura da fase oleosa. A adição de um agente

tensoativo ajuda a aumentar a eficiência da encapsulação, uma vez que por diminuição de tensão de superfície do ativo, resulta numa maior incorporação deste nas micropartículas (PASSERINI, 2003).

Em todos os métodos de emulsificação são comuns os passos 1, 2 e 3 apresentados na Figura 7, variando somente a metodologia de recuperação das micropartículas lipídicas. Na Figura 7 está representado o método de emulsificação onde as micropartículas são recuperadas por filtração e secagem (ALMEIDA; MULLER; SOUTO, 2007).

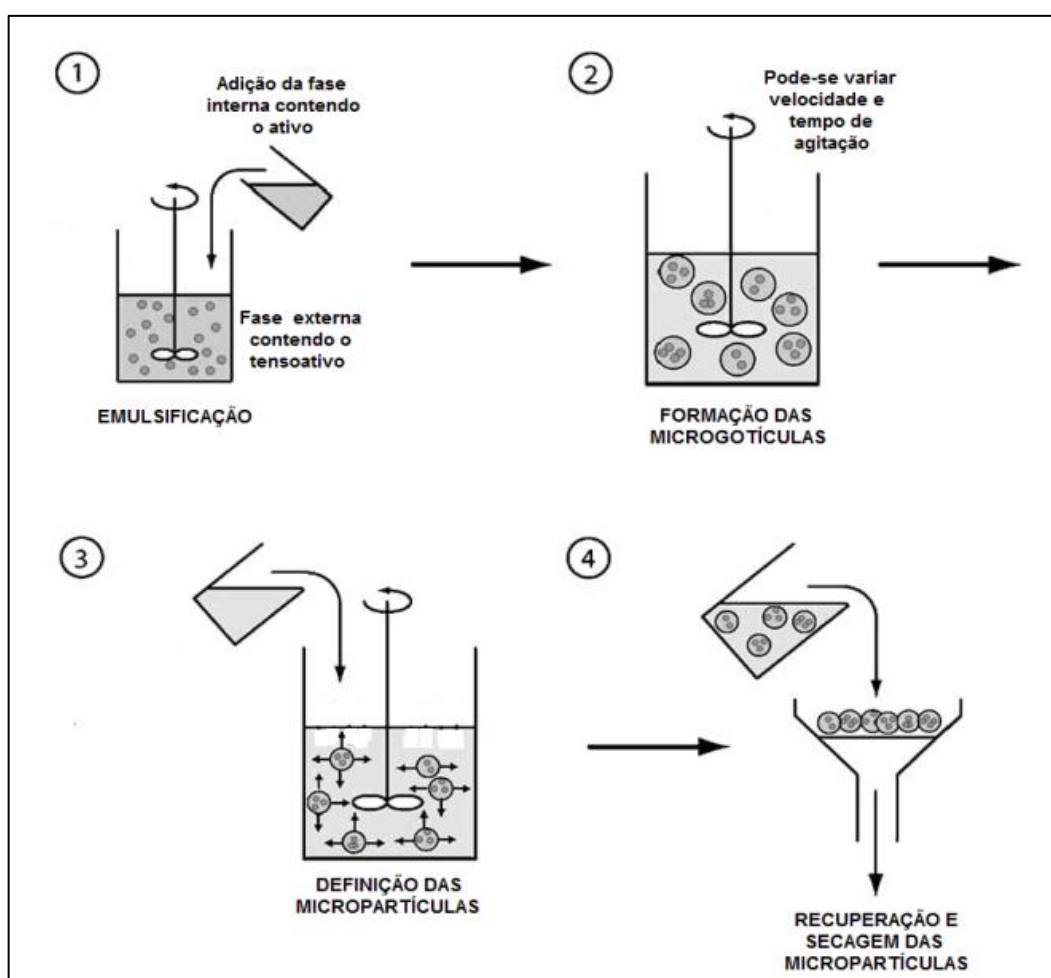


FIGURA 7 - PREPARAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS POR MEIO DO MÉTODO DE EMULSIFICAÇÃO

FONTE: Adaptado de FREITAS; MERKLE; GANDER (2005)

São descritos basicamente três modelos para incorporação de ativos em partículas lipídicas sólidas (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002):

1. Modelo de matriz homogênea
2. Modelo de superfície externa enriquecida

3. Modelo de núcleo enriquecido

A estrutura obtida depende da composição da formulação (lipídios, substância ativa, agente tensoativo) e das condições de produção (homogeneização quente versus frio) (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Uma matriz homogênea, com o ativo molecularmente disperso ou o ativo presente em aglomerados amorfos é comumente obtido pela aplicação do método de homogeneização a frio e pela incorporação de ativos muito lipofílicos no processo de homogeneização a quente. Nesse último, durante a fase de resfriamento, as gotas de óleo produzidas cristalizam e nenhuma separação de fases entre o lipídio e o componente ativo é observada (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

O método de superfície externa enriquecida com o ativo pode ser obtido quando a separação de fases ocorre durante o processo de resfriamento do lipídio fundido para a formação das partículas. O lipídio precipita primeiro, formando um núcleo praticamente livre de ativo, com a cristalização do ativo ao redor, no lipídio líquido remanescente (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Já o método de núcleo enriquecido com ativo ocorre com o processo oposto, isto é, com a precipitação primeiro do ativo, deixando a superfície externa com menos ativo (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Quanto a liberação do ativo, a literatura relata a liberação como função da temperatura de processamento das partículas. O perfil de liberação é geralmente bifásico, isto é, inicia-se com uma pronta liberação do ativo seguida de uma liberação prolongada. Essa pronta liberação é maior quando as partículas são produzidas a altas temperaturas e pela utilização do método de homogeneização a quente. Com a diminuição da temperatura de processamento essa condição é minimizada, sendo praticamente inexistente pela aplicação do método de homogeneização a frio (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Além da temperatura, a porcentagem de tensoativo utilizada também pode controlar a pronta liberação. A altas concentrações de tensoativo uma alta taxa de liberação imediata é observada, enquanto que baixas concentrações de tensoativo resultam na minimização desse fenômeno. Isso é explicado pelo efeito de redistribuição do composto ativo entre as fases lipídica e aquosa durante o processo de aquecimento e consequente resfriamento após processo de emulsão do óleo em água pela técnica de homogeneização a quente. Pelo aquecimento da mistura de óleo e água um aumento na solubilidade do ativo em água ocorre, fazendo com que

o mesmo migre da gota de lipídio para a fase aquosa. Após homogeneização, a emulsão é resfriada, dando início à cristalização do núcleo lipídico, ainda que uma concentração considerável do ativo esteja na fase aquosa. Esse resfriamento leva a supersaturação do composto em água fazendo com que o mesmo retorne a fase lipídica. Uma vez que o núcleo já está praticamente formado o ativo ficará armazenado ao redor do mesmo, acumulando-se na superfície externa da partícula lipídica (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Dessa maneira, conclui-se que quanto maior a solubilidade do ativo na fase aquosa durante a produção das partículas, mais pronunciado é esse efeito de pronta liberação. A solubilidade aumenta com o aumento da temperatura de produção e aumento da concentração de tensoativo e praticamente não ocorre a baixas temperaturas, baixa concentração de tensoativo ou em meios livres de tensoativo (MULLER; RADTKE; WISSING, 2002).

Quanto à estabilidade física das partículas, o estado sólido das matrizes lipídicas é capaz de reduzir a mobilidade molecular, permitindo uma liberação da substância ativa prolongada. Entretanto, a natureza dessa matriz é também fonte de problemas de instabilidade devido a etapa de cristalização e a formação de polimorfos (LACERDA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes

- Acetona PA (Biotec);
- Ácido acético glacial (Synth);
- Ácido salicílico (PharmaSpecial);
- Água purificada obtida por sistema de destilação;
- Álcool etílico PA (Êxodo Científica);
- Cera de abelha (FarmanilQuima);
- Fenolftaleína (Neon);
- Hidróxido de sódio PA (Impex);
- Metanol grau HPLC (JT Baker);
- Óleo de mamona (FarmanilQuima);
- Polissorbato 80 (Tween 80[®]) (DEG);
- Vermelho de fenol (Neon);

4.1.2 Equipamentos

- Agitador Mecânico (IKA[®], modelo RW20 digital);
- Balança Analítica (Adventurer, OHAUS, Modelo AE2140BR);
- Balança Termogravimétrica (SHIMADZU, modelo TGA-50);
- Banho-Maria (EDUTECH, Modelo EEQ-9074);
- Centrifuga para tubos (IEC, modelo CL);
- Cromatógrafo (MERCK-HITASHI);
- Destilador de água (Modelo DL/DA De Leo & Cia Ltda);

- Difratorômetro de raios X (SHIMADZU, modelo XRD-6000);
- Espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU, modelo IR Prestige-21);
- Estufa a vácuo (TECNAL, modelo TE 395);
- Microscópio eletrônico de varredura (SHIMADZU, modelo SSX-550 Superscan);
- Microscópio óptico (OLYMPUS, modelo CX21);
- Placa de Aquecimento (LABSTORE);
- Sistema de calorimetria exploratória diferencial (SHIMADZU, modelo DSC-60);
- Termômetro de mercúrio escala -10°C a 150°C.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Pureza do ácido salicílico

A pureza do ácido salicílico foi determinada conforme a Farmacopeia Brasileira 5ª edição (ANVISA, 2010) pelo preparo de uma solução contendo 0,5 g de ácido salicílico dissolvidos em 50 mL de álcool etílico previamente neutralizado com hidróxido de sódio e completado o volume de 100 mL com água destilada. Essa solução foi titulada com solução 0,5 M de hidróxido de sódio, em triplicata.

4.2.2 Solubilidade do ácido salicílico

A solubilidade do ácido salicílico foi determinada pela adição crescente de 0,1 g de ácido salicílico em 10g do solvente testado. A cada adição verificou-se visualmente a solubilidade do ácido: caso solúvel mais 0,1 g era acrescentado; caso contrário, a mistura era aquecida em placa de aquecimento e resfriada para a

verificação de um possível aumento na solubilização do mesmo. As amostras que se apresentaram visualmente solubilizadas foram ainda avaliadas em lâmina e verificadas ao microscópio óptico, em aumento de 4X para a verificação de possíveis cristais não dissolvidos.

4.2.3 Obtenção das micropartículas lipídicas sólidas

As micropartículas lipídicas foram preparadas conforme descrito por Gifani e colaboradores (2009) com as seguintes alterações: uma solução aquosa contendo polisorbato 80 foi aquecida a 70°C em banho-maria e vertida sobre uma fase oleosa (70°C), contendo 1g de ácido salicílico. Após o tempo de emulsão, a mesma foi resfriada para formação das partículas.

4.2.3.1 Variações na metodologia

4.2.3.1.1 Adição de óleo à matriz cerosa

Considerando que a técnica descrita por Gifani e colaboradores (2009) resultava em uma baixa eficiência de encapsulação e que sua repetição levou a formação de partículas que não se rompiam com a fricção ou pressão sobre a pele, propôs-se a adição de um óleo compatível com a cera de abelha e o ácido salicílico que compusesse a matriz cerosa para deixá-la adequada ao uso proposto e também para melhorar a encapsulação do ativo.

4.2.3.1.2 Adição de água no processo de preparo das partículas

Visto que alguns autores como GOWDA *et.al.* (2011) e SHAH (2002), partindo da mesma metodologia de formação de micropartículas lipídicas utilizaram água gelada para o processo de resfriamento no lugar de um banho de gelo, o mesmo teste foi feito para verificação da alternativa mais adequada.

A partir dos resultados obtidos nesses dois experimentos, a metodologia inicial foi alterada nesses pontos específicos e, mantendo constantes a quantidade de ácido salicílico (5%), a temperatura de emulsificação (70°C) e o tempo com agitação da emulsão para o processo de resfriamento (1minuto), os parâmetros críticos relevantes ao processo de obtenção das partículas contendo ácido salicílico foram determinados, conforme descrito abaixo:

a) Determinação da concentração adequada cera de abelha:óleo

O óleo selecionado foi acrescentado em proporções crescentes à cera de abelha com redução proporcional de sua massa, conforme demonstrado na Tabela 2.

b) Determinação da concentração de tensoativo

Foram testadas as concentrações de 0%, 0,25%; 0,50%, 0,75% e 1,0%.

c) Determinação do volume de fase aquosa na emulsão

Relação fase oleosa:aquosa 1:1; 1:2,5; 1:5; 1:7,5 e 1:10 (p/v).

d) Determinação do tempo de emulsificação

Tempo de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos.

e) Determinação da velocidade de agitação

Velocidade de agitação de 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 e 1400 rpm/min.

TABELA 2 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ADEQUADA CERA DE ABELHA:ÓLEO

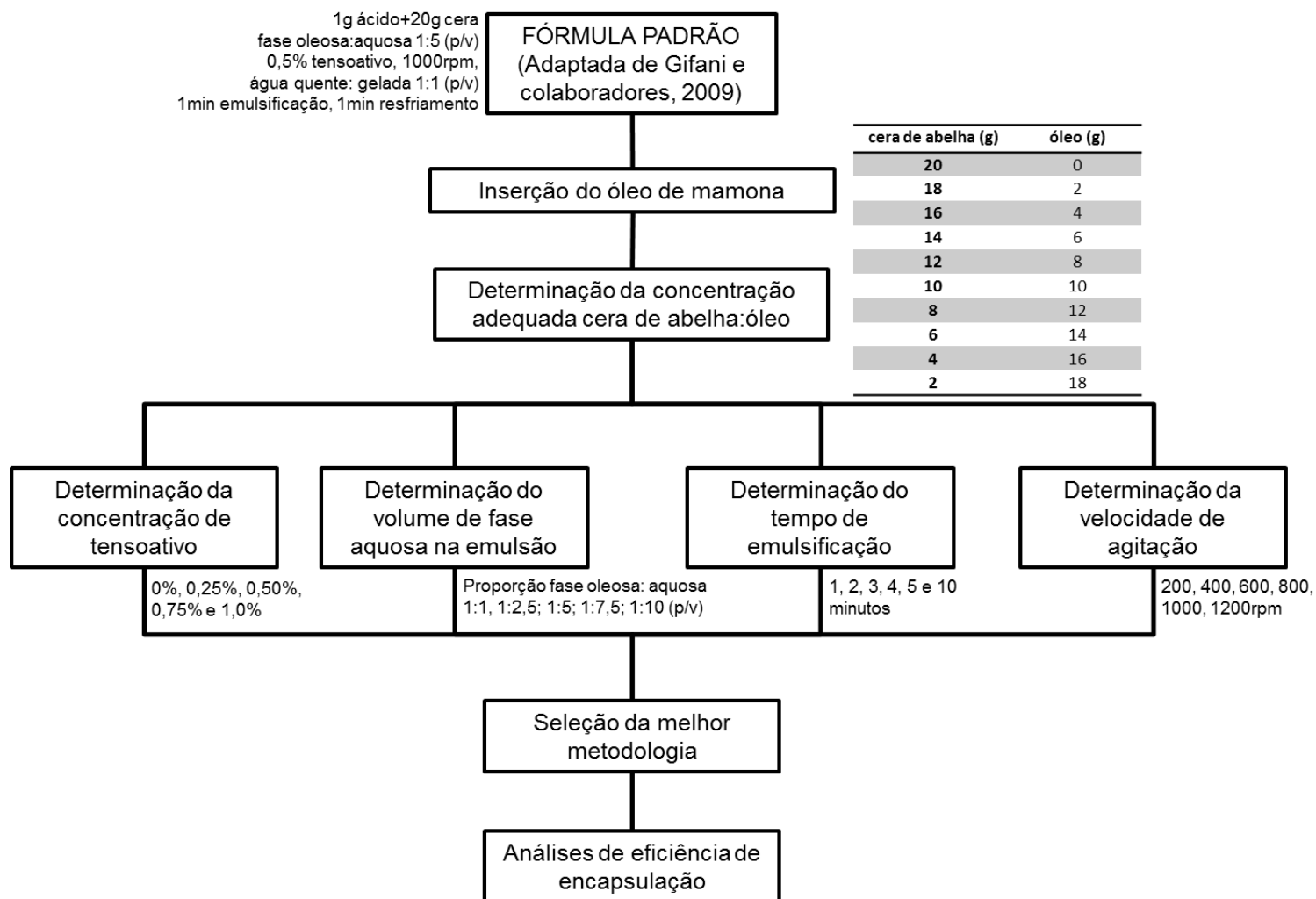
Experimento	cera de abelha (g)	óleo (g)
1	20	0
2	18	2
3	16	4
4	14	6
5	12	8
6	10	10
7	8	12
8	6	14
9	4	16
10	2	18

FONTE: O autor (2014)

Uma vez definida a melhor proporção cera de abelha:óleo esta foi mantida durante a realização dos experimentos de análise da quantidade de tensoativo, proporção de fases aquosa/oleosa, tempo de emulsificação e velocidade de agitação.

Após determinação e avaliação desses parâmetros e seleção da melhor condição para formação das partículas, uma nova formulação considerando-os foi proposta e analisada, conforme Fluxograma descrito na Figura 8.

FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DEMOSTRATIVO DAS VARIAÇÕES NA METODOLOGIA DE MICROENCAPSULAÇÃO



FONTE: O autor (2015)

4.2.3.2 Rendimento de produção dos das partículas

O rendimento de produção das partículas (R) foi calculado pela razão entre a massa obtida após preparação, pela massa inicial equivalente à soma das massas utilizadas de cera de abelha, óleo de rícino e ácido salicílico, conforme Equação 1.

$$R = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa inicial}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.2.3.3 Caracterização das partículas

A caracterização das partículas foi determinada por meio de Microscopia Óptica e Eletrônica de Varredura.

4.2.3.3.1 Tamanho e morfologia

A morfologia das partículas foi observada ao microscópio óptico, com imagens capturadas através do software da câmera Tsview-TCA 1.31C (LOPEZ; FERNANDEZ, 2001; SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000). Pelo mesmo software e sistema, foram analisadas 100 partículas para determinação de sua distribuição de tamanho.

A análise morfológica também foi determinada ao microscópio eletrônico de varredura SSX-550 Superscan (Shimadzu Co.). As partículas foram submetidas à estufa a vácuo TE 395 (Tecnal) e após serem fixadas em suporte metálico foram submetidas à metalização com ouro no equipamento IC-50 Ion Coater (Shimadzu Co.). As micrografias foram obtidas por meio de diferentes magnificações, após visualização das amostras, por meio de voltagens de aceleração de 10 e 15kV. O registro ocorreu pelo uso de software específico.

4.2.4 Eficiência de microencapsulação

A análise da eficiência de encapsulação do ativo nas partículas foi feita por meio de técnicas de caracterização, denominadas qualitativas e técnicas de doseamento, conhecidas como quantitativas.

4.2.4.1 Análise qualitativa

As técnicas qualitativas utilizadas foram Análise de Difração de Raios-X, Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) e Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED).

4.2.4.1.1 Análise de Difração de Raios X

Para análise de possíveis picos indicativos de cristalinidade, as micropartículas, bem como seus componentes ácido salicílico e cera de abelha foram analisados em Difratorômetro de Raios X modelo Shimadzu XRD-6000, scan de $2^\circ.\text{min}^{-1}$ e 2θ de 5° a 80° , radiação $K\alpha$ de cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), corrente de 40 mA e voltagem 40 kV (CANEVAROLO JR., 2004).

4.2.4.1.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

As micropartículas foram analisadas por Espectroscopia na Região do Infravermelho em pastilha de brometo de potássio (KBr), empregando 4 mg de amostra e 196 mg de KBr grau espectroscópico (2% em massa), no equipamento

modelo IR Prestige-21 (Shimadzu Co.), 32 λ scans.min⁻¹, resolução de 4cm⁻¹. Os espectros obtidos por infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) das partículas foram avaliados frente ao espectro do ácido salicílico, da cera de abelha e do óleo de mamona.

4.2.4.1.3 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

A estabilidade térmica das micropartículas foi estudada através das curvas de Análise Termogravimétrica, obtidas na faixa de temperatura entre 283K (10°C) e 1173K (900°C). Para isso, uma termo balança modelo TGA-50 da marca Shimadzu foi empregada, sob razão dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), empregando uma razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, em cadinho de platina contendo aproximadamente $5 \pm 0,1$ mg de amostra. O equipamento foi previamente aferido com sulfato de cobre penta-hidratado.

A curva de CED foi elaborada para o ácido salicílico, cera de abelha e micropartículas obtidas, na faixa de temperatura entre 15°C e 205°C. Foi utilizada uma célula calorimétrica da marca Shimadzu, modelo DSC-60, em atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹, sendo que a amostra (2,5 mg) foi acondicionada em cápsula de alumínio fechada. O equipamento foi previamente calibrado com índio (m.p.=429,6 K; $\Delta H_{fusão} = 28,54 \text{ J.g}^{-1}$) e zinco (m.p. = 692,6 K).

4.2.4.2 Análise quantitativa

As análises para quantificação do ácido salicílico foram feitas por meio de titulação volumétrica ácido-base e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Duas análises preliminares foram conduzidas: titulação direta, por meio da extração do ácido presente no interior das partículas; e indireta, pela análise do ácido não encapsulado presente na água do processo de encapsulação.

De posse dos resultados das duas titulações, aquela mais adequada foi selecionada para a quantificação do ácido nos demais experimentos.

4.2.4.2.1 Titulação direta

Com a finalidade de recuperar o ácido salicílico encapsulado, as micropartículas foram colocadas na presença dos seguintes sistemas solventes: água, etanol e água:etanol 1:1 (v/v) previamente neutralizados com hidróxido de sódio 0,1 M até ponto de viragem da fenolftaleína. Para cada sistema solvente foram analisados os processos a frio e a quente (banho-maria a 60°C), sob agitação manual, centrifugação ou filtração a vácuo para separação do solvente dos demais componentes da matriz cerosa, para determinação do sistema com maior taxa de recuperação. Após recuperação, os solventes foram titulados com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até ponto de viragem da fenolftaleína.

4.2.4.2.2 Titulação indireta

Para verificação da possível presença de ácido salicílico não encapsulado no processo de obtenção das partículas e, por consequência remanescente na água de processo, foi conduzida uma titulação do tipo indireta.

Após formação das partículas, as mesmas permaneceram em seu líquido de processo em repouso a temperatura ambiente e no escuro por 48 horas. Após este período uma alíquota da água de processo foi retirada e titulada com hidróxido de sódio 0,1 M a temperatura ambiente.

Partindo da hipótese de que exista ácido na água de processo e que o mesmo possa eventualmente cristalizar, possibilitando resultados errôneos na titulação, foi acrescentado individualmente álcool etílico e acetona na proporção de 1:2 (v/v) água:solvente para aumentar a solubilidade do ácido no meio. Água destilada contendo álcool etílico ou acetona na proporção 1:2 (v/v) foram

previamente titulados com hidróxido de sódio 0,1 M e fenolftaleína como indicador para prova em branco.

Após verificação do melhor meio de titulação, a titulação indireta da água de processo ocorreu de duas maneiras. A titulação básica indireta foi conduzida pela titulação da água de processo com solução 0,1 M de hidróxido de sódio tendo como indicador a fenolftaleína. A titulação ácida indireta ocorreu em duas etapas, iniciando com a alcalinização da água do processo com solução 0,1 M de hidróxido de sódio em quantidade excedente ao conteúdo de ácido salicílico encontrado na titulação ácida e posterior titulação com solução 0,1 M de ácido acético até viragem do indicador vermelho de fenol (FSSAI, 2012).

Em ambos os casos, para que fossem descontadas as possíveis interferências de outros componentes presentes na água de processo, uma amostra da água proveniente da formação de partículas que não continham ácido salicílico também foi titulada, sendo o valor obtido dessa análise descontado dos demais obtidos para as partículas contendo ácido salicílico.

4.2.4.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O doseamento do ácido salicílico por CLAE foi realizado nas partículas e na água de processo de obtenção das partículas.

Estudos preliminares para quantificação do ácido salicílico encapsulado foram avaliados, considerando os solventes metanol, acetonitrila e etanol, utilizando 1 g de partículas, com agitação das amostras por 5 minutos individualmente em cada solvente e centrifugadas a 7.000 rpm durante 15 minutos, com processo de recuperação repetido. O mesmo processo foi feito para as micropartículas sem ácido salicílico (branco) para determinação de possíveis interferências no doseamento.

O método de recuperação do ácido salicílico foi modificado, utilizando 1g de partículas, aquecidas em banho-maria a 60°C em 10ml de metanol até fusão das partículas, seguido de ultrasonicação por 1 minuto e centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e o processo de extração do ácido salicílico foi repetido por três vezes com o mesmo precipitado para recuperação do

mesmo, sendo o sobrenadante colocado em balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com metanol.

As amostras foram analisadas em Cromatógrafo Merck-Hitashi, bomba L2130 Elite LaChrom, degaseificador L7812, válvula de injeção Rheodyne 7725i, detectores DAD L2450 Elite LaChrom, interface EZChrom Elite conectada ao sistema operacional Windows NT e coluna de fase reversa C18 X-TERRA (240mm comprimento e 4,6mm de diâmetro interno), associada a uma pré-coluna. A fase móvel (A) foi constituída de ácido fosfórico 0,1M em 0,01M de ácido sulfúrico e a (B) de metanol. A eluição foi isocrática, na proporção de 60:40 (v/v), vazão de 1,00 mL.min⁻¹ e amostra injetada de 10 µl com detector configurado para 280 nm. Todas as amostras foram filtradas em filtro de membrana de 45 µm de celulose modificada e feita uma curva de calibração contendo concentrações conhecidas e crescentes de ácido salicílico.

As amostras injetadas no CLAE foram diluídas em metanol e em metanol/água 1:1 (v/v).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PUREZA DO ÁCIDO SALICÍLICO

Os experimentos de pureza do ácido salicílico apresentaram valor médio de 98,5%.

5.2 SOLUBILIDADE DO ÁCIDO SALICÍLICO

A solubilidade do ácido salicílico em água fria apresentou variação do citado na literatura, sendo insolúvel na proporção de 1:460 (ANFARMAG, 2001; ANVISA, 2010).

Quanto à sua solubilidade em óleo de mamona, esteve de acordo com o descrito na literatura, ou seja, 1:10 (ácido:óleo p/p) conforme Manual da ANFARMAG (2001).

Ainda, o ácido salicílico foi testado em outros óleos vegetais com aplicação dérmica, sendo eles: óleo de semente de uva, óleo de girassol, óleo de amêndoas doces, óleo mineral, vitamina E e um éster denominado C12-15 benzoato de alquila, sendo o ácido salicílico muito pouco solúvel em todos eles, chegando a no máximo 0,3:10 (ácido:óleo p/p), sendo isso possível apenas após grande tempo de contato e agitação entre o ácido e o óleo ou éster utilizado.

Dessa forma, demonstrada a maior solubilidade do ácido no óleo de mamona, o mesmo foi selecionado para todos os experimentos de microencapsulação.

5.3 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO

5.3.1 Micropartículas lipídicas de ácido salicílico

Conforme descrito no item 4.2.3.1 de Material e Métodos, o primeiro experimento realizado com base na metodologia descrita por Gifani e colaboradores (2009) referiu-se à utilização de água gelada ou banho de gelo para o processo de resfriamento da emulsão e consequente formação das partículas.

Segundo RODRIGUES-RACT e colaboradores (2004), a velocidade de resfriamento de lipídios representa um fator de grande importância no tamanho, número e forma polimórfica de cristais, envolvida no rearranjo estrutural das formas α , β e β' . Mazzanti e colaboradores (2004) analisaram a gordura do leite por Difração de Raios X e observaram que uma alta velocidade de resfriamento associada a baixas temperaturas finais de cristalização resultam na formação de cristais na forma α metaestável, que posteriormente formam uma mistura de cristais dos tipos β e β' , enquanto que baixas velocidades de resfriamento e altas temperaturas finais de cristalização resultam na formação de cristais do tipo β' , sem a presença de cristais do tipo α ou β .

Ainda, segundo Souto e colaboradores (2011), a organização tridimensional da matriz lipídica durante o processo de resfriamento é dependente da velocidade com que isso ocorre e de sua composição. Quando a velocidade é lenta, as cadeias hidrocarbonadas dos lipídios podem se rearranjar numa forma mais ordenada e estável. Já com uma velocidade de resfriamento elevada, a solidificação da matriz ocorre rapidamente, rearranjando-se numa forma polimórfica mais instável, α , com menor grau de empacotamento lipídico, maior mobilidade e consequentemente maior incorporação do princípio ativo.

Assim, a água gelada foi utilizada no processo de resfriamento do sistema emulsionado porque diminuiu mais rapidamente a sua temperatura do que o banho de gelo, influenciando a tendência ao rearranjo polimórfico α , que propicia maior incorporação do princípio ativo e maior dispersão das partículas (SOUTO *et.al.*, 2011).

5.3.1.1 Variáveis críticas ao processo de obtenção das partículas

Para identificação dos parâmetros críticos ao processo de microencapsulação, algumas variáveis na metodologia proposta por Gifani e colaboradores (2009) foram conduzidas, conforme descrito no item 4.2.3.1 de Material e Métodos. Todos os experimentos foram quantificados por meio de titulação ácida indireta.

5.3.1.1.1 Parâmetro proporção de cera de abelha – óleo de mamona

As micropartículas formadas apenas de ácido salicílico e cera de abelha, conforme metodologia descrita por Gifani e colaboradores (2009) mostraram-se relativamente disformes, com cristais de ácido salicílico visíveis na fase externa aquosa do sistema emulsionado, como pode ser observado na Figura 9.

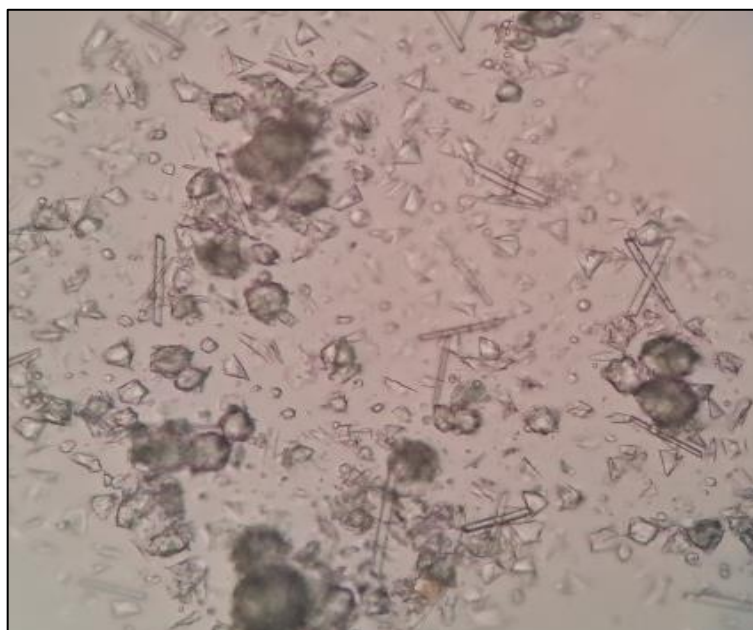


FIGURA 9 – RECRISTALIZAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO NA FASE EXTERNA AQUOSA DO SISTEMA EMULSIONADO NO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO EM CERA DE ABELHA (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha contendo ácido salicílico em aumento de 40x)

FONTE: O autor (2014)

Na Figura 10 pode-se também observar cristais de ácido salicílico na fase externa aquosa do sistema emulsionado.

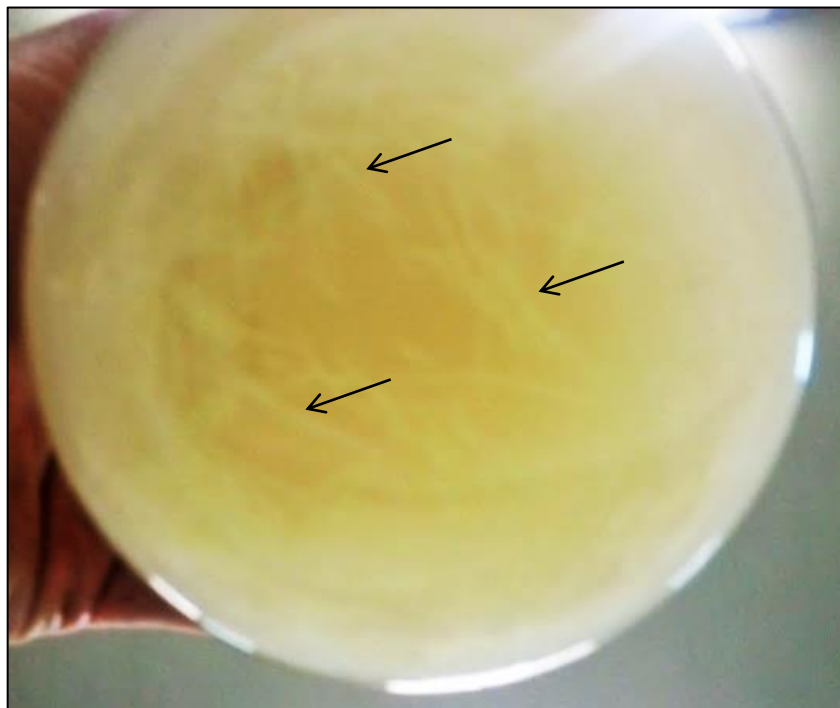


FIGURA 10 – CRISTAIS VISÍVEIS MACROSCOPICAMENTE AO FINAL DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO
FONTE: O autor (2014)

Isto ocorreu porque durante o processo de emulsificação o lipídio funde e sua viscosidade diminui, facilitando a dissolução do princípio ativo em concentração próxima da saturação. Neste estágio de processo o princípio ativo difunde-se para a fase externa aquosa. Esta dissolução é tanto mais acentuada quanto maior for a hidrossolubilidade do princípio ativo, a temperatura da fase aquosa e a concentração do tensoativo nesta fase (SOUTO *et.al.*, 2011).

Após a homogeneização cria-se uma região de sobressaturação do princípio ativo à volta das gotículas de lipídio fundido recém-formadas. Quando se inicia o processo de resfriamento do sistema emulsionado, o princípio ativo presente na fase aquosa externa tem sua solubilidade diminuída e há tendência ao retorno à fase lipídica que está em processo de solidificação, com consequente aumento da viscosidade. Este processo influencia a acomodação das moléculas lipídicas em diferentes formas polimórficas e, assim, o modo de incorporação do ativo nas partículas e sua posterior liberação (SOUTO *et.al.*, 2011).

A solidificação da matriz lipídica é dependente da velocidade de resfriamento do lipídio e da sua composição, e constitui um fator muito importante para a incorporação do princípio ativo nas partículas devido à organização tridimensional adquirida (SOUTO *et.al.*, 2011).

Os triacilgliceróis, constituídos por um tipo de ácido graxo, originam partículas altamente cristalinas e organizadas, com poucos locais para acomodar as moléculas do princípio ativo, induzindo sua expulsão da matriz lipídica sólida (SOUTO *et.al.*, 2011).

As misturas de mono, di e triacilgliceróis e as misturas de diferentes ácidos graxos formam cristais com muitas imperfeições, o que origina espaços para acomodar as moléculas de princípio ativo aumentando a capacidade de carga da partícula (SOUTO *et.al.*, 2011).

Nas ceras, o polimorfismo cristalino é drasticamente reduzido, prevalecendo a forma ortorrômbica, com velocidade de transição polimórfica lenta (ROSSAN, 2011), que dificulta a acomodação do ativo na estrutura da micropartícula.

Apesar de apresentar 40% de sua composição química composta por monoésteres, possui também hidroximonoésteres (aprox., 9%), diésteres (aprox. 7%), hidrocarbonetos (14-16%) e ácidos graxos livres (12-15%) que, compondo uma mistura de diferentes ácidos graxos, tende a formação de algumas imperfeições em sua estrutura cristalina, com espaços para acomodação do ativo (FNAP, 2009).

Além disso, segundo Varshosaz e Keihanfar (2001), a presença de ácidos graxos livres como ácido cerótico na estrutura da cera aumenta a sua afinidade com a base livre do ativo, melhorando a eficiência de encapsulação.

Com isso, Gifani e colaboradores (2009) obtiveram em seu estudo um conteúdo de ativo de 22-45% nas microesferas, mas também identificaram a presença de cristais de ácido salicílico na solução aquosa com o resfriamento.

Com o objetivo de reduzir essa cristalização externa do ácido salicílico, com consequente aumento na eficiência de encapsulação do sistema, e considerando que os resultados de solubilidade do ácido salicílico demonstraram ser o óleo de mamona o mais eficaz, as proporções de 18:2, 16:4, 14:6, 12:8, 10:10, 8:12, 6:14, 4:16 e 2:18 cera de abelha:óleo de mamona (p/p) foram analisadas para compor as partículas.

A partir da proporção de 18:2 não foram encontrados cristais de ácido salicílico no interior do recipiente contendo as partículas no sistema emulsionado.

Segundo Lacerda (2009), matrizes lipídicas formadas a partir de misturas de lipídios sólidos e óleos também apresentam imperfeições em sua estrutura cristalina, causadas pela presença do óleo, favorecendo a acomodação de moléculas de ativo.

Além disso, a associação de lipídios sólidos e óleos proporciona a obtenção de uma matriz sólida, que dificulta a difusão do ativo, com regiões líquidas que possuem elevada capacidade de solubilização de ativos lipofílicos (ALMEIDA, MULLER, SOUTO, 2007; JENNING *et.al.*, 2000).

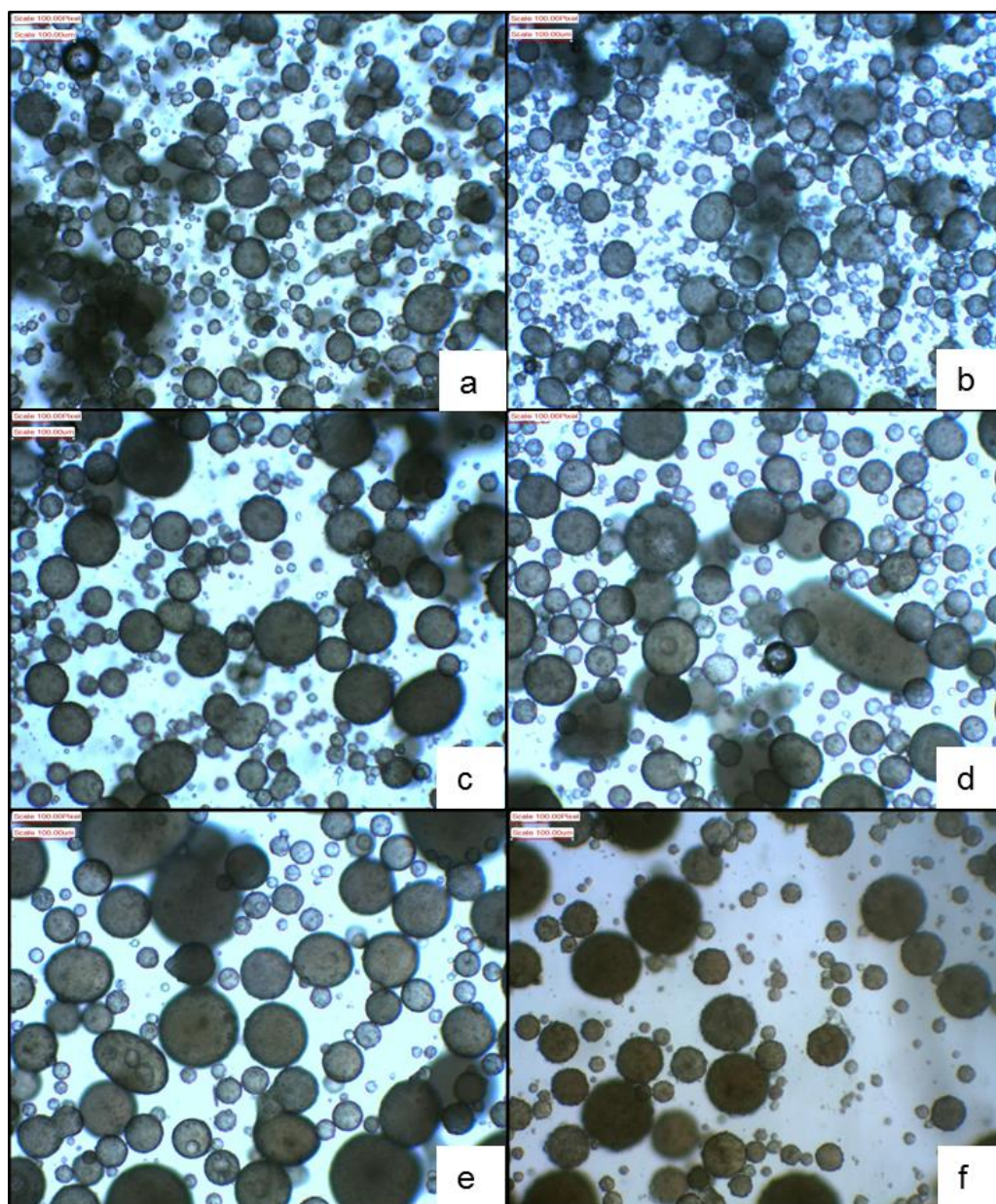


FIGURA 11 – VARIAÇÕES NA PROPORÇÃO CERA DE ABELHA: ÓLEO DE MAMONA PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico. Em (a) 20:0 cera de abelha:óleo de mamona, (b) 18:2, (c) 16:4, (d) 14:6, (e) 12:8, (f) 10:10. Aumento de 10x)
FONTE: O autor (2014)

Observando-se a Figura 11, percebe-se um arredondamento das partículas com o aumento do óleo na sua composição.

Quanto à interferência do óleo de mamona na eficiência de encapsulação, na Tabela 3 estão descritos os resultados obtidos por titulação ácida indireta.

TABELA 3 – EFICIÊNCIA DE MICROENCAPSULAÇÃO NAS DIFERENTES PROPORÇÕES CERA DE ABELHA:ÓLEO DE MAMONA

Experimento nº	Cera de Abelha (g)	Óleo de mamona (g)	% encapsulação
1	20	0	54
2	18	2	54
3	16	4	70
4	14	6	77
5	12	8	78
6	10	10	85
7	8	12	85
8	6	14	86
9	4	16	88
10	2	18	-

FONTE: O autor (2015)

Verifica-se que no Experimento 1, composto apenas por cera de abelha, uma porcentagem de encapsulação de 54% foi obtida. Já com a utilização de 4g de óleo (Experimento 3), um aumento de aproximadamente 30% na eficiência do sistema foi observado.

Essa baixa eficiência encontrada pelo uso apenas da cera de abelha está de acordo com o descrito por Gifani e colaboradores (2009) em seu estudo de microencapsulação do ácido salicílico em microesferas de cera de abelha, onde descreveu uma porcentagem de princípio ativo de 22-52% na micropartícula.

Conforme anteriormente discutido, segundo Wissing e colaboradores (2004), um ativo, quando incorporado em uma matriz lipídica, se localiza entre as camadas lipídicas e imperfeições presentes, sendo que uma estrutura altamente ordenada, constituída por moléculas similares, apresentará pequenas imperfeições, dificultando a acomodação de uma grande quantidade de ativo.

Entretanto, segundo o mesmo autor, o uso de lipídios complexos como mono-, di-, triglicerídeos, com diferentes tamanhos de cadeia, facilita a incorporação de maior quantidade de ativo, pois, sendo espacialmente diferentes, a distância entre as cadeias de ácido graxo dos glicerídeos aumenta, levando a maiores imperfeições e espaços de acomodação para o ativo encapsulado (LACERDA, 2009; WISSING, KAYSER, MULLER, 2004).

A proporção 10:10 (Experimento 6) foi caracterizada como a mais adequada, uma vez que apresentou um aumento significativo na eficiência de encapsulação, com boas características sensoriais prévias para aplicação dérmica como maciez e rompimento por pressão. Segundo Rodrigues-Ract e colaboradores (2010), a proporção adequada entre as fases lipídicas sólida/óleo levam a um produto com textura e funcionalidade (espalhabilidade) desejadas pelo consumidor.

Em proporções maiores que 10:10, apesar de formadas, as partículas mostraram-se muito frágeis ao toque e processamento, chegando ao ponto de não se formarem, na proporção de 2:18 (Experimento 10).

Com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se que para todos os demais experimentos, uma proporção de 10:10 cera de abelha:óleo de mamona (p/p) seria utilizada.

Em paralelo esses mesmos experimentos foram feitos com amostras denominadas branco para verificar a possível interferência dos demais componentes do processo na titulação do ácido salicílico sendo que nenhuma interferência foi verificada pela metodologia de titulação ácida indireta nas condições avaliadas.

5.3.1.1.2 Parâmetro porcentagem de tensoativo

Segundo Giannola e colaboradores (1995) e Gowda e Shivakumar (2007), a incorporação do fármaco na microesfera de cera/óleo requer a adição de um surfactante a uma concentração ideal para reduzir a tensão interfacial entre o material hidrofóbico e a fase aquosa externa.

Com base nisso, porcentagens crescentes do tensoativo polissorbato 80 foram acrescentadas a fase aquosa da emulsão para seleção da mais adequada.

Na Tabela 4 estão descritos os valores de eficiência de encapsulação obtidos por titulação ácida indireta para as diferentes concentrações de tensoativo, onde se pode observar que um aumento no seu percentual não interferiu na eficiência de encapsulação, bem como na forma das partículas, conforme a Figura 12.

TABELA 4 – VARIAÇÕES NA PORCENTAGEM DE TENSOATIVO

% tensoativo	% encapsulação
0	-
0,25	78
0,50	77
0,75	76
1,0	75

FONTE: O autor (2015)

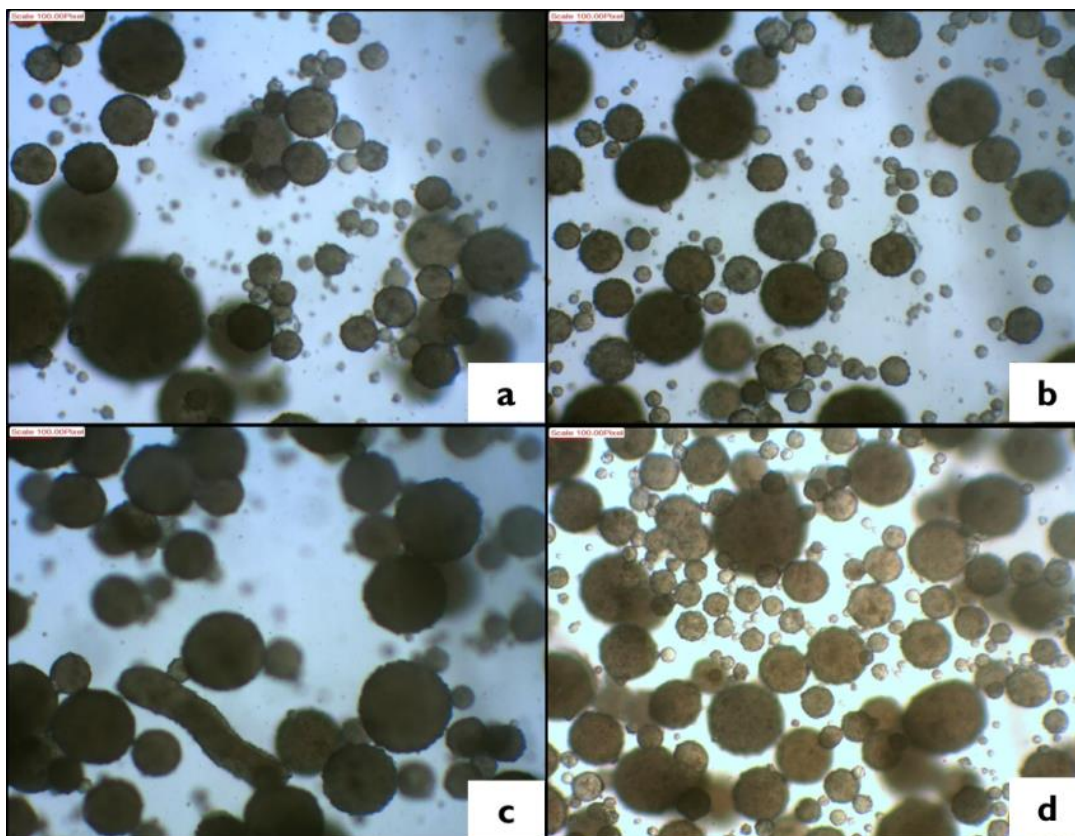


FIGURA 12 – VARIAÇÕES NA PORCENTAGEM DE TENSOATIVO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico com variações na porcentagem de polissorbato 80. Em a 0,25%; b 0,5%; c 0,75%; d 1,0%. Aumentos de 10x)
FONTE: O autor (2014)

Segundo Souto e colaboradores (2011), a concentração de tensoativo é um dos determinantes para o fenômeno de difusão do princípio ativo para a fase externa aquosa, sendo quanto maior a concentração do tensoativo, mais acentuado esse fenômeno. Além disso, segundo os mesmos autores, quando a fase aquosa externa contém excesso de moléculas de tensoativo, outras espécies coloidais podem ser formadas, como os lipossomas, que possivelmente incorporam moléculas de ativo, diminuindo a eficiência de encapsulação.

Em relação à escolha do tensoativo utilizado, o mesmo se fez conforme descrito por Gowda e Shivakumar (2007) em seu estudo de preparação de microesferas cerosas de carbonato de lítio, onde descrevem melhores resultados com o uso de polissorbato 80 para cera de abelha, bem como por Gifani e colaboradores (2009) com a utilização de polissorbato 80 para formação de micropartículas de cera de abelha contendo ácido salicílico.

Em todos os experimentos de doseamento por titulação foram descontadas as possíveis interferências dos demais componentes das micropartículas na determinação da quantidade de ácido salicílico. Para isso, a titulação de uma amostra da água de processo proveniente da formação de micropartículas de cera de abelha e óleo de mamona na proporção 10:10 foi feita e subtraída nos cálculos matemáticos.

Considerando que foram muito próximos os percentuais de encapsulação entre os experimentos contendo 0,25% e 0,50% de tensoativo e que Gifani e colaboradores (2009) descreveram a utilização de 0,50% em seus experimentos, foi estabelecida a porcentagem de 0,50% (p/v) de polissorbato 80, dissolvido na água de emulsão, para todos os demais experimentos.

5.3.1.1.3 Parâmetro volume de água para emulsificação

Estudos prévios demonstraram que a utilização de proporções iguais de fase aquosa e fase oleosa para emulsificação (1:1 p/v) não levaram a formação das micropartículas, com presença de aglomerados de cera.

Assim, volumes maiores de água para emulsificação foram analisados para verificação da melhor proporção para formação de micropartículas esféricas e uniformes, conforme descrito na Tabela 5.

TABELA 5 – VARIAÇÕES NO VOLUME DE ÁGUA PARA EMULSIFICAÇÃO

Proporção fase oleosa:aquosa (p/v)	Volume de água para emulsificação (ml)	% encapsulação
1:2,5	50	75
1:5	100	77
1:7,5	150	79
1:10	200	80

FONTE: O autor (2014)

Para cada experimento realizado, a mesma quantidade de água utilizada no processo de emulsificação foi também utilizada para o resfriamento da emulsão.

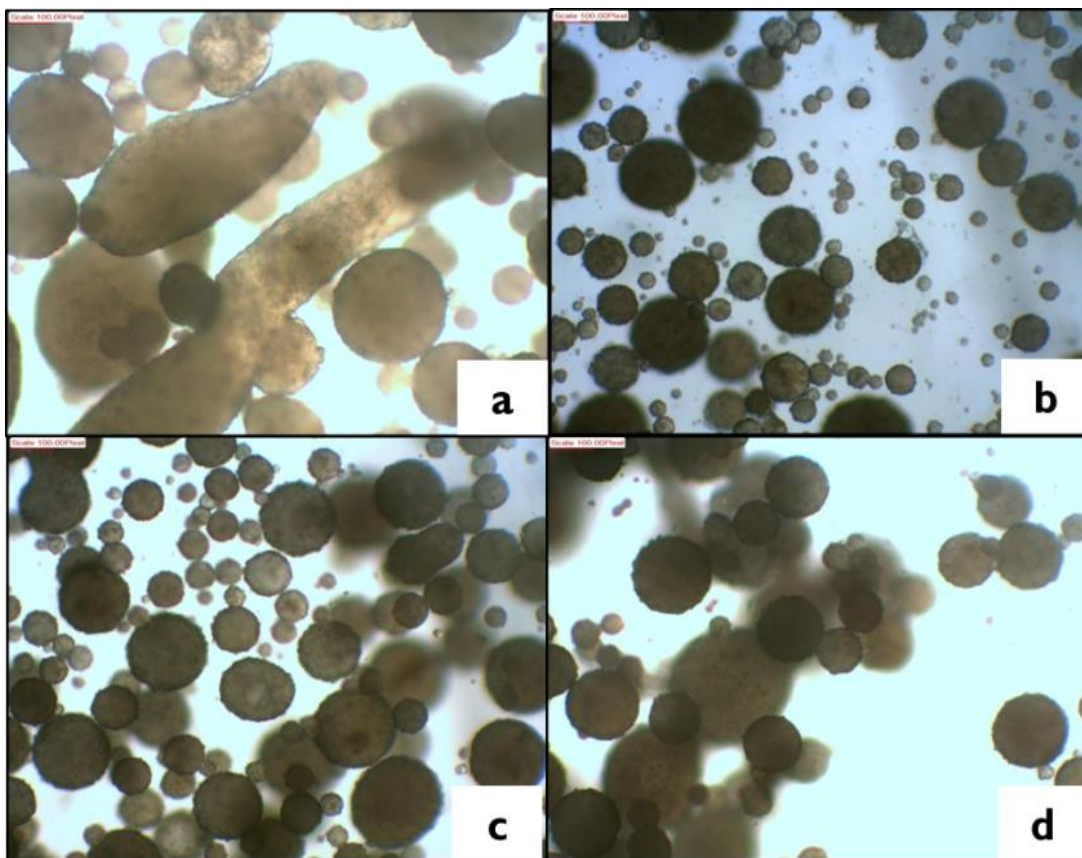


FIGURA 13 – VARIAÇÕES NO VOLUME DE ÁGUA PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico com variações na proporção volume de fase oleosa:aquosa (p/v). Em a) 1:2,5; b) 1:5; c) 1:7,5; d) 1:10. Aumentos de 10x)
FONTE: O autor (2014)

A primeira análise, utilizando 50 mL de água a quente e 50 mL gelada não foi adequada, com formação de partículas grandes e disformes, conforme demonstrado na Figura 13. Mas, ao dobrar esse volume em ambas as etapas (emulsificação 100 mL e resfriamento 100 mL), as mesmas passaram a apresentar formato esférico, proporção escolhida para os demais experimentos. A adição de maior volume de água não demonstrou microscopicamente uma melhora na morfologia das partículas, mas apresentou melhora na porcentagem de microencapsulação, conforme Tabela 5.

Segundo Souto e colaboradores (2011), um volume maior de solução aquosa resfriada diminui o risco de agregação das partículas, enquanto que um

volume menor pode não ser suficiente para dispersar a totalidade da microemulsão, obtendo-se partículas de maior tamanho.

Em todos esses experimentos de doseamento por titulação, foram descontadas as possíveis interferências dos demais componentes das micropartículas na determinação da quantidade de ácido salicílico. Para isso, a titulação ácida de uma amostra da água de processo proveniente da formação de micropartículas de cera de abelha e óleo de mamona na proporção 10:10 foi feita e subtraída nos cálculos matemáticos.

5.3.1.1.4 Parâmetro velocidade de agitação

Segundo Gowda e Shivakumar (2007) e Gifani e colaboradores (2009) o fator de maior importância na distribuição de tamanho das microesferas é a velocidade e o tempo de agitação. Um aumento na velocidade de agitação diminui o tamanho das esferas e conseqüentemente seu rendimento, pois microesferas menores são perdidas durante o processo de lavagem.

Conforme demonstrado na Figura 14, com o aumento da velocidade de agitação observou-se diminuição do tamanho das partículas. Na utilização de 200 rpm as partículas não se formaram individualmente, apenas um aglomerado de fase oleosa foi visível após término do processo.

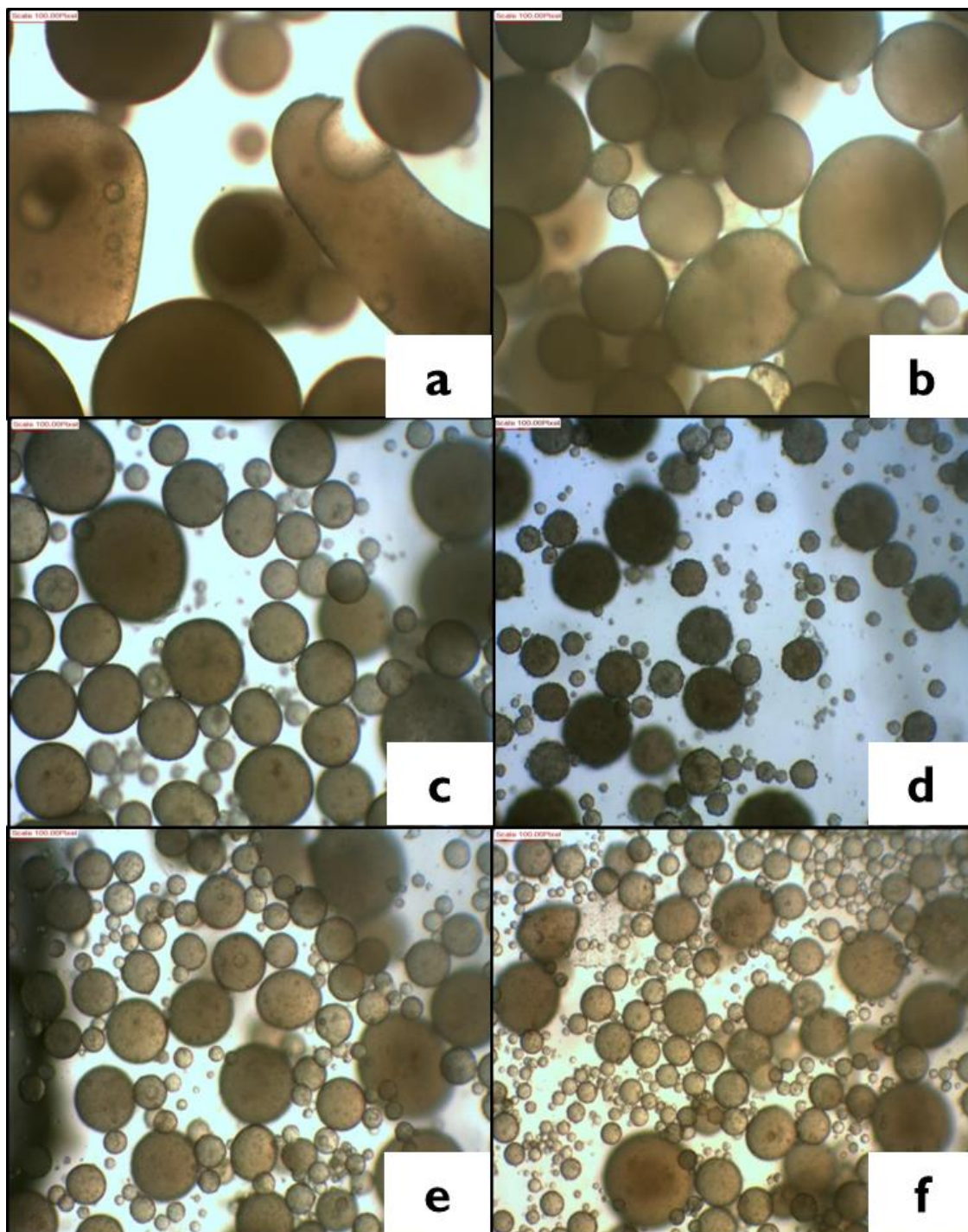


FIGURA 14 – VARIAÇÕES NA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico com variações na velocidade de agitação. Em a) 400rpm; b) 600rpm; c) 800rpm; d) 1000rpm; e) 1200rpm; f) 1400rpm. Aumentos de 10x)
 FONTE: O autor (2014)

Quanto à porcentagem de encapsulação, descrita na Tabela 6, os mesmos mostraram-se muito próximos, demonstrando que o parâmetro velocidade de agitação está intimamente relacionado apenas a aspectos morfológicos das

micropartículas que, apesar de menores com o aumento da agitação, mantiveram uma semelhante eficiência de encapsulação.

TABELA 6 – VARIAÇÕES NA VELOCIDADE DE AGITAÇÃO

Velocidade de agitação (rpm)	% encapsulação
200	-
400	75
600	76
800	76
1000	77
1200	76
1400	76

FONTE: O autor (2014)

Considerando a morfologia das partículas optou-se pela velocidade de 1000 rpm para os demais experimentos.

Em todos esses experimentos de doseamento por titulação, foram descontadas as possíveis interferências dos demais componentes das micropartículas na determinação da quantidade de ácido salicílico. Para isso, a titulação de uma amostra da água de processo proveniente da formação de micropartículas de cera de abelha e óleo de mamona na proporção 10:10 foi feita e subtraída nos cálculos matemáticos.

5.3.1.1.5 Parâmetro tempo de emulsificação

Considerando que o parâmetro tempo de emulsificação, segundo Gowda e Shivakumar (2007) é de suma importância na distribuição de tamanho das micropartículas, experimentos com 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos foram realizados, conforme demonstrado na Figura 15.

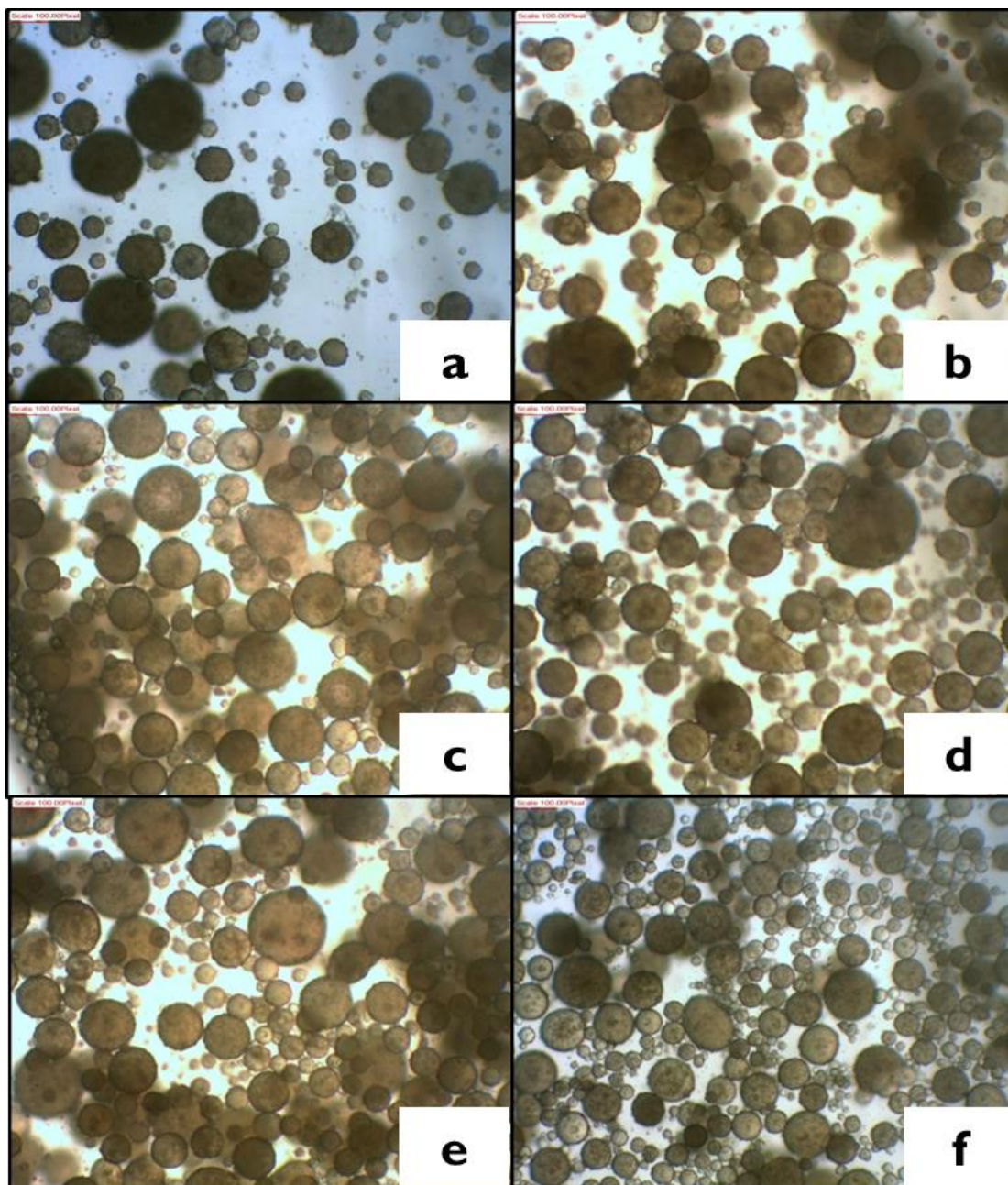


FIGURA 15 – VARIAÇÕES NO TEMPO DE EMULSIFICAÇÃO PARA OBTENÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico com variações no tempo de emulsificação. Em a) 1min.; b) 2min.; c) 3min.; d) 4min.; e) 5min.; f) 10min. Aumentos de 10x)
FONTE: O autor (2014)

Conforme é possível observar na Figura 15, as partículas formadas com 10 minutos de emulsificação aparentaram maior quantidade de partículas menores.

Pela análise visual, observou-se que com o aumento do tempo de emulsificação, a água de processo mostrava aspecto turvo, provavelmente pela maior presença de micropartículas menores que pouco visíveis ao olho nu, mostravam-se como turbidez do processo.

Pela observação dos resultados descritos na Tabela 7, verifica-se que o tempo de emulsificação não é uma variável crítica ao processo no que diz respeito à eficiência de encapsulação, uma vez os valores obtidos encontram-se muito próximos.

TABELA 7 – VARIAÇÕES NO TEMPO DE EMULSIFICAÇÃO

Tempo de emulsificação (min)	% encapsulação
1	77
2	78
3	78
4	78
5	78
10	78

FONTE: O autor (2014)

Considerando a análise dos dados, o tempo de emulsificação foi estabelecido em 1 minuto para os demais experimentos.

Em todos esses experimentos de doseamento por titulação, foram descontadas as possíveis interferências dos demais componentes das micropartículas na determinação da quantidade de ácido salicílico. Para isso, a titulação de uma amostra da água de processo proveniente da formação de micropartículas de cera de abelha e óleo de mamona na proporção 10:10 foi feita e subtraída nos cálculos matemáticos.

5.3.1.2 Análises microscópicas

5.3.1.2.1 Análise da distribuição de tamanho e morfologia das micropartículas por microscopia óptica

Após todos os parâmetros estabelecidos, a partir da formulação adaptada de Gifani e colaboradores (2009), foram determinados os parâmetros tamanho e morfologia das micropartículas. Conforme demonstrado na Tabela 8, a maior

porcentagem de micropartículas distribue-se na faixa de 10 a 40 μm , demonstrado na Figura 16.

TABELA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS

Porcentagem de partículas	Faixa de tamanho (μm)
58%	10 – 40
24%	40 – 70
18%	Maior que 70

FONTE: O autor (2014)

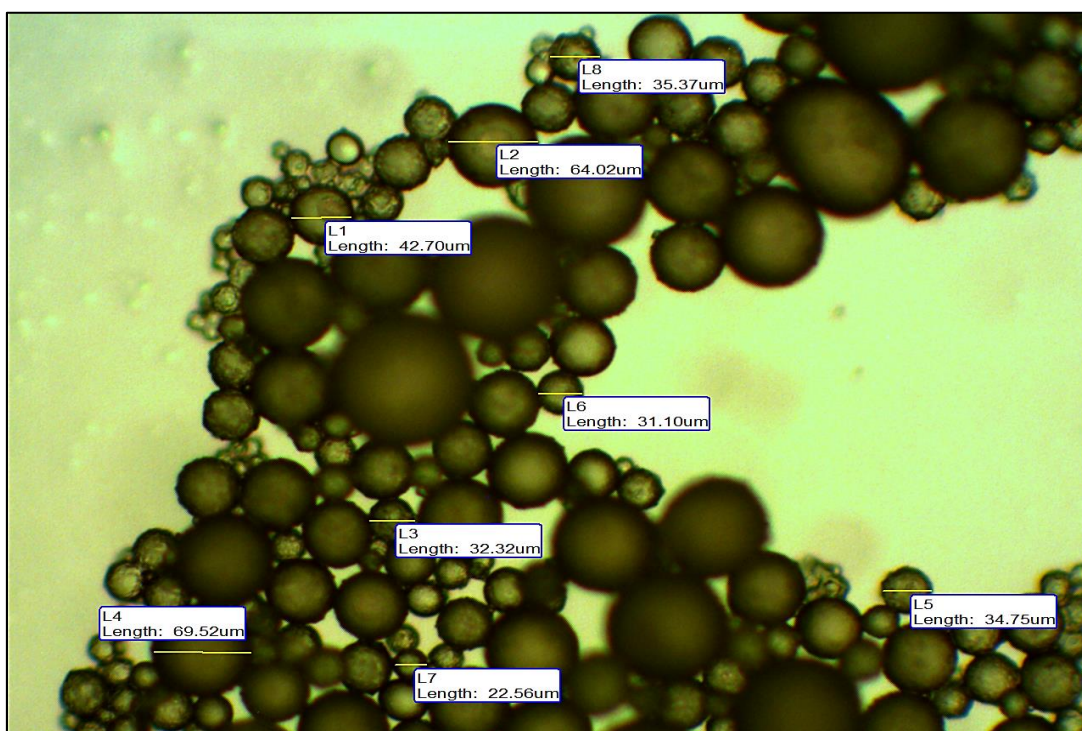


FIGURA 16 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO SALICÍLICO (Microscopia óptica de micropartículas de cera de abelha/óleo de mamona contendo ácido salicílico. Aumentos de 10x)

FONTE: O autor (2014)

A olho nu, após filtradas a vácuo e secas, as micropartículas apresentaram-se como pó fino de coloração levemente amarelada e tamanho uniforme, demonstrada na Figura 17.



FIGURA 17 – MICROPARTÍCULAS LIPÍDICAS DE ÁCIDO SALICÍLICO APÓS PROCESSO DE SECAGEM (Micropartículas filtradas a vácuo e secas à temperatura ambiente)
FONTE: O autor (2014)

5.3.1.2.2 Análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura

Os resultados obtidos por MEV para o ácido salicílico, cera de abelha e micropartículas contendo ou não o ativo estão indicados na Figura 18 (a-i). As fotomicrografias a, b e c evidenciam a morfologia cristalina do ácido salicílico. Em d e e, a forma rugosa e sem estrutura definida da cera de abelha. Já as imagens de f a i, divididas em partículas lipídicas sem ácido salicílico (imagens f e g) e contendo ácido salicílico (h e i) não apresentaram diferenças morfológicas significativas, demonstrando que o ácido salicílico não interferiu nas características de formato esférico e uniforme e superfície rugosa das micropartículas, resultado semelhante ao observado por Gifani e colaboradores (2009) ao preparar micropartículas de cera de abelha com ácido salicílico utilizando o método da dispersão sólida por fusão. Estruturas cristalinas referentes ao ácido salicílico puro não foram verificados na superfície das micropartículas lipídicas contendo o ativo (Figura 19 h-i).

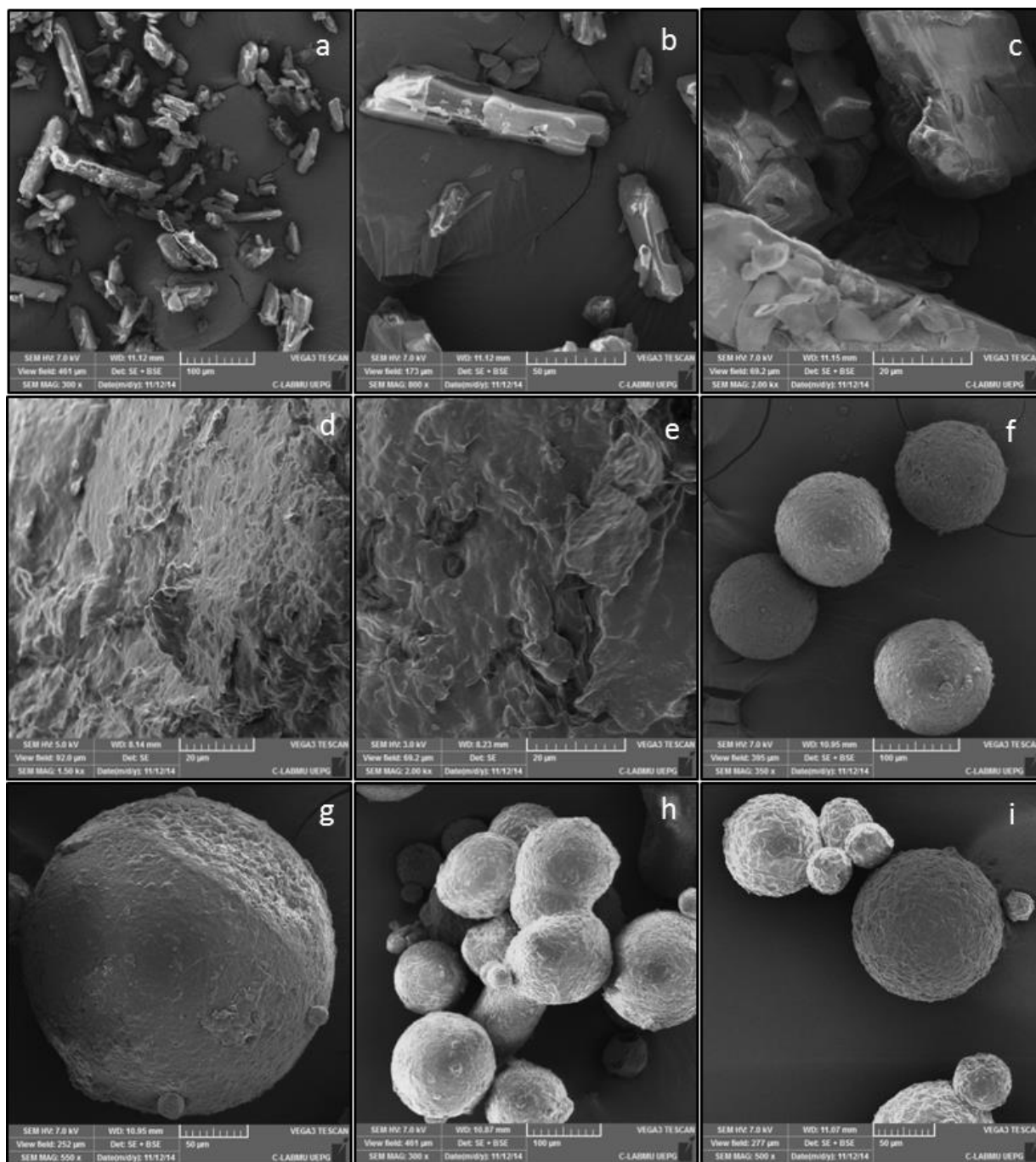


FIGURA 18 – FOTOMICROGRAFIAS DAS MICROPARTÍCULAS DE ÁCIDO SALICÍLICO E SEUS CONSTITUTES

FONTES: CLABMU (2014)

NOTA: Microscopia Eletrônica de Varredura. Em a), b) e c) aspectos morfológicos do ácido salicílico nos aumentos de 300x, 800x e 2000x, respectivamente; d) e e) cera de abelha em 1500x e 2000x; f) e g) micropartículas lipídicas sem ácido salicílico em 350x e 550x; h) e i) micropartículas lipídicas contendo ácido salicílico em 300x e 500x.

5.3.1.3 Rendimento das micropartículas

Com base na metodologia modificada de Gifani e colaboradores (2009) o rendimento médio das micropartículas foi de 101,48%. Considerando que em todo processo há perdas, um rendimento superior a 100% sugere que as micropartículas incorporaram água de processo a sua estrutura. Essa incorporação não pode ser descontada devido a forma de análise desse parâmetro pois as partículas foram secas apenas a temperatura ambiente para posterior pesagem visto que o processo de secagem em estufa não era possível pelo baixo ponto de fusão das mesmas.

5.3.2 Eficiência de microencapsulação

Estabelecidas todas as variáveis para obtenção das micropartículas, uma nova formulação foi proposta, conforme fluxograma descrito na Figura 8, composta pelos melhores resultados obtidos, sendo analisada sua eficiência de encapsulação por técnicas qualitativas e quantitativas.

5.3.2.1 Análises qualitativas

As análises utilizadas para qualificar a formação das micropartículas foram Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED), Análise de Difração de Raios X, Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

5.3.2.1.1 Análise Térmica por Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)

A análise térmica por calorimetria exploratória diferencial é muito importante na caracterização de partículas lipídicas sólidas, pois fornece informações sobre a cristalinidade das mesmas, a qual influencia diretamente a eficiência de encapsulação, a velocidade de liberação do ativo e a expulsão do mesmo durante o processo de estocagem. Caso o lipídio passe da forma α para β' , e dessa para β , com o aumento da formação desse polimorfo mais estável, o retículo cristalino torna-se mais perfeito, levando a expulsão do ativo das partículas (MARCATO, 2009; JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000).

Além dessas informações, a CED fornece a temperatura e entalpia de fusão das partículas, sendo que um valor alto de entalpia sugere uma alta organização no retículo cristalino, pois a fusão de um cristal altamente organizado exige mais energia para superar as forças de coesão do retículo cristalino do que um cristal pouco ordenado ou amorfo (MARCATO, 2009).

Na análise térmica por CED o material teste e um referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura para medição da diferença de energia fornecida a ambos. Por meio dela, os efeitos do calor associados a alterações físicas ou químicas da amostra podem ser acompanhados, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação, congelamento, inversões de estruturas cristalinas), reações de desidratação, dissociação, decomposição, oxido-redução, entre outras, visto que essas alterações são capazes de provocar variações de calor (IONASHIRO, 2004).

Com o propósito de investigar o comportamento térmico das micropartículas lipídicas de ácido salicílico, foram obtidos os termogramas do ácido salicílico, da cera de abelha, das partículas carregadas com o fármaco e daquelas sem conter o ativo. Os resultados obtidos por CED estão apresentados nas Figuras 19-22, respectivamente. O ácido salicílico puro apresentou um evento endotérmico nítido em 159°C, o qual corresponde a sua temperatura de fusão (IQBC, 2004). A cera de abelha demonstrou uma temperatura de fusão a 63°C, condizente com a anteriormente relatada. Com relação às micropartículas de cera de abelha carregadas com o fármaco, o evento típico de fusão do ácido salicílico não foi observado na curva CED, indicativo de que ocorreu a amorfização do fármaco.

Segundo Gowda e Shivakumar (2007) a ausência de um pico endotérmico na mesma temperatura do ativo indica que o mesmo está uniformemente distribuído a nível molecular na micropartícula, caracterizando assim também um sistema matricial.

Castelli e colaboradores (2005) investigaram, por meio de CED a organização e distribuição de lipídios em nanopartículas lipídicas sólidas e em carreadores lipídicos nanoestruturados e a dispersão do ativo indometacina nas partículas. Por meio da técnica de microemulsão, as partículas de behenato de glicerila (lipídio sólido) e migliol (lipídio líquido) foram preparadas. Os autores observaram que os carreadores eram formados por nanocompartimentos oleosos no interior da matriz sólida e que o ativo possuía maior solubilidade no óleo do que na matriz lipídica. Isso comprovado pelas curvas de CED onde o migliol sozinho e o migliol com o ativo não demonstraram nenhum pico calorimétrico, resultado da completa dissolução do ativo no óleo.

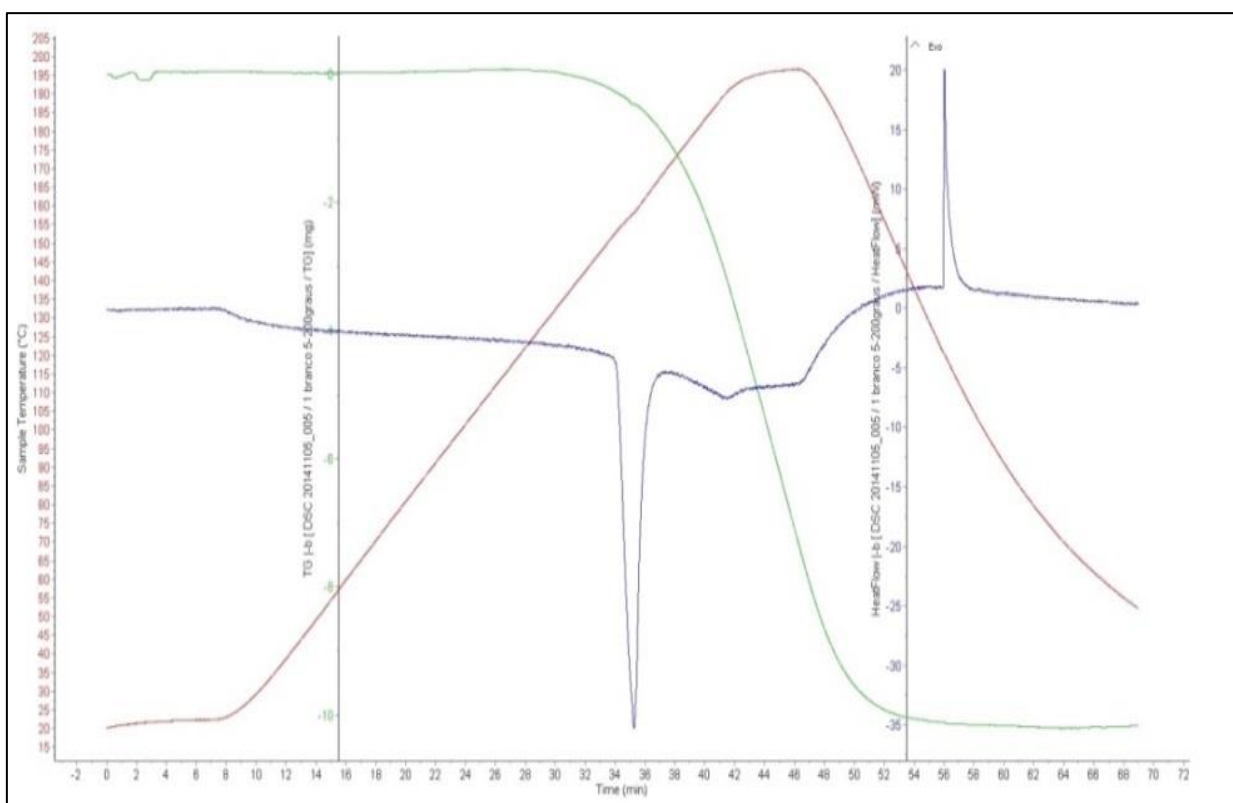


FIGURA 19 – CURVA DE CED DO ÁCIDO SALICÍLICO
FONTE: CLABMU (2014)

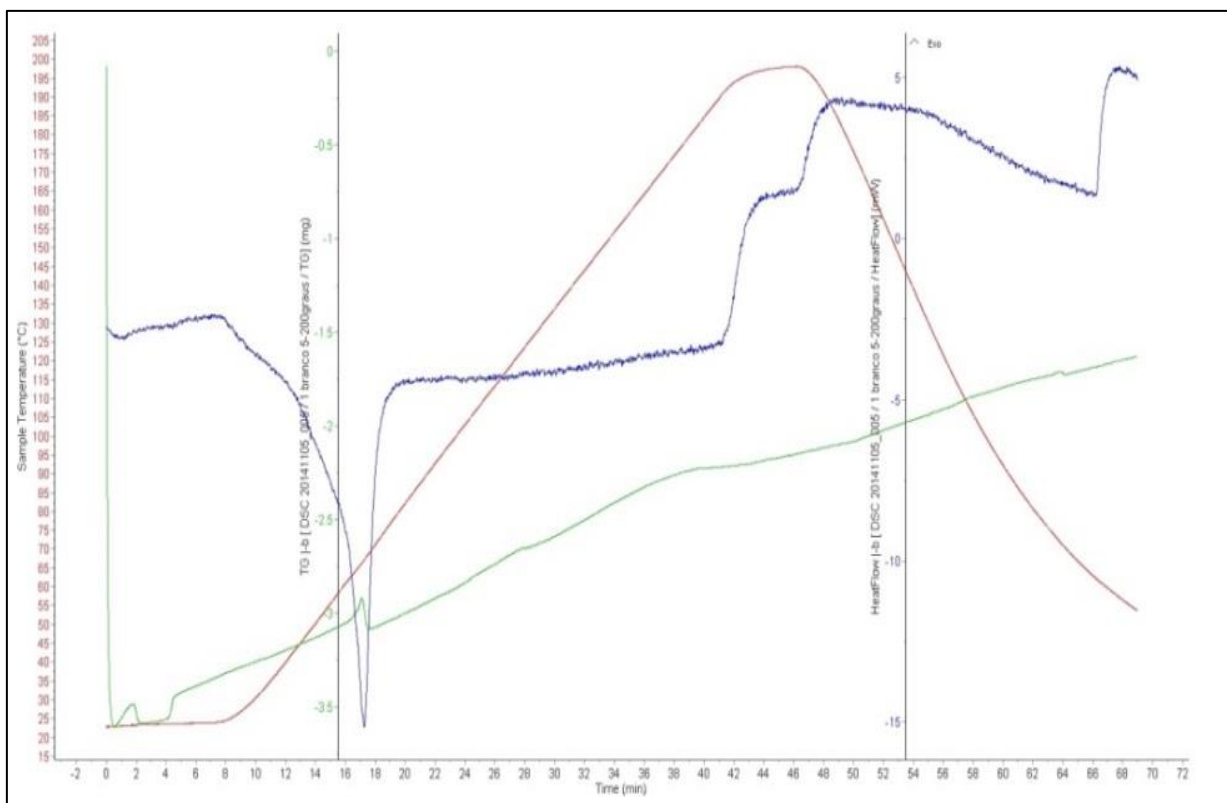


FIGURA 20 – CURVA DE CED DA CERA DE ABELHA
FONTE: CLABMU (2014)

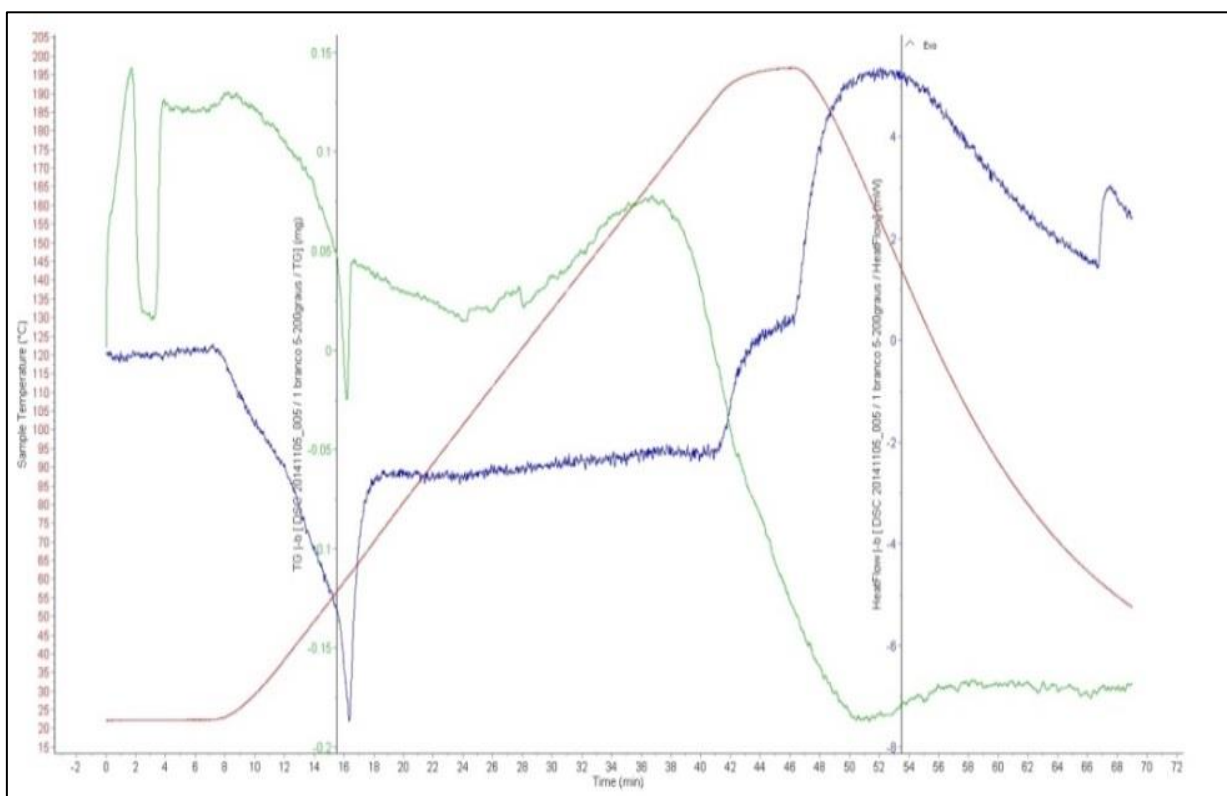


FIGURA 21 – CURVA DE CED DA MICROPARTÍCULA CONTENDO ÁCIDO SALICÍLICO
FONTE: CLABMU (2014)

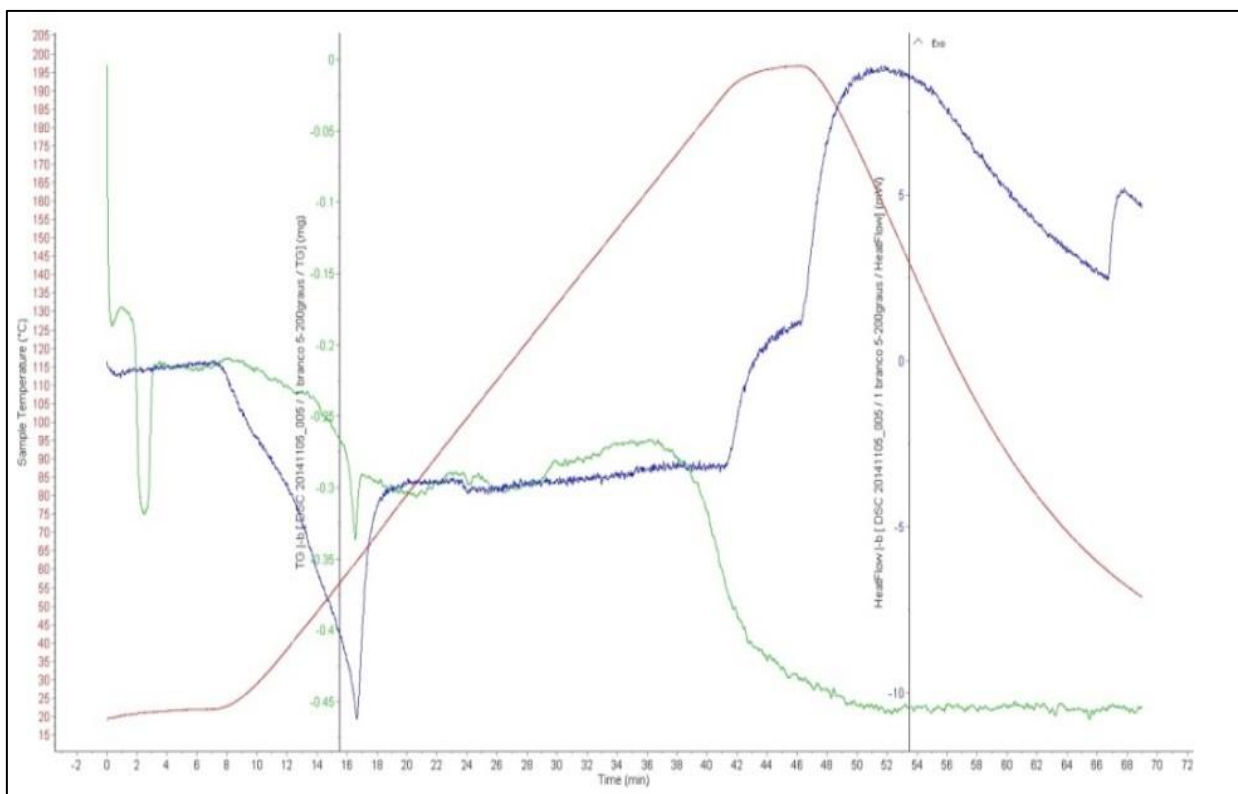


FIGURA 22 – CURVA DE CED DA MICROPARTÍCULA SEM ÁCIDO SALICÍLICO
FONTE: CLABMU (2014)

5.3.2.1.2 Análise de Difração de Raios X (DRX)

Uma das técnicas mais utilizadas para a caracterização da estrutura polimórfica de partículas lipídicas sólidas é a difração de raios X. Por meio dela, determina-se o comprimento dos espaçamentos longos e curtos do retículo lipídico; diferencia-se entre um material amorfo ou cristalino e se avalia a influencia do constituinte óleo nos espaçamentos longos dos cristais dos carreadores lipídicos estruturados. Entretanto, a associação dessa metodologia à calorimetria diferencial de varredura é importante, pois essa é capaz de diferenciar sólidos amorfos e líquidos (MARCATO, 2009).

A análise de difração de raios X é uma ferramenta essencial para a elucidação das propriedades dos lipídios e suas misturas (ATTAMA; SCHICKE; MULLER-GOYMANN, 2006).

A Figura 23 sumariza os resultados obtidos por Difratometria de Raios X para o ácido salicílico puro, a cera de abelha e as partículas com e sem a presença do ácido salicílico.

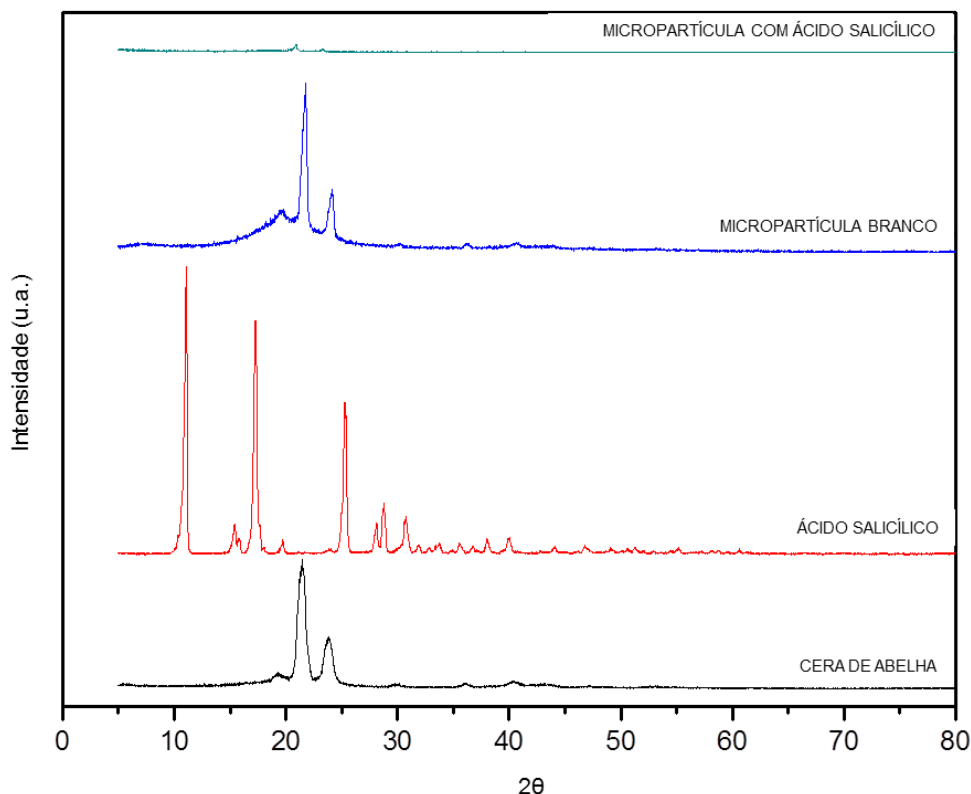


FIGURA 23 – DIFRATOGRAMAS DA CERA DE ABELHA, ÁCIDO SALICÍLICO PURO, E DAS MICROPARTÍCULAS COM E SEM ÁCIDO SALICÍLICO
FONTE: CLABMU (2014)

O ácido salicílico apresentou cinco principais picos intensos em $2\theta = 11,07$; $17,26$; $25,20$; $28,82$ e $30,73$, que indicam o seu elevado grau de cristalinidade e estão de acordo com dados encontrados na literatura (JI et al. 2011). A cera de abelha revelou apenas 3 picos em $2\theta = 19,20$; $21,53$; $23,70$.

Já as partículas branco (compostas apenas pela mistura de cera de abelha e óleo de mamona, sem ácido salicílico) apresentaram picos característicos em $2\theta = 19,41$; $21,75$; $24,12$ e as partículas de ácido salicílico em $2\theta = 20,90$ e $23,27$. No caso das partículas de ácido salicílico, o comportamento menos cristalino indica a solubilização do fármaco na matriz utilizada, uma vez que não são encontrados picos de cristalinidade semelhantes ao ácido salicílico.

Os resultados de DRX demonstram que o procedimento de microencapsulação acarretou uma redução expressiva da intensidade dos picos de difração cristalina do ácido salicílico, conduzindo à amorfização do ativo (ANSARI

et.al., 2011). Esse resultado está de acordo com o descrito por Chen e colaboradores (2006) que encapsularam podofilotoxina em nanopartículas lipídicas sólidas de tripalmitato e da mesma forma observaram que o pico de difração do ativo desapareceu quando na forma encapsulada, concluindo que o mesmo estava em seu estado amorfo. Além disso, esse desaparecimento dos picos característicos do ácido salicílico nas micropartículas formadas indica que o mesmo está molecularmente disperso, caracterizando um sistema matricial.

5.3.2.1.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (IVTF)

Os espectros de IVTF para as micropartículas contendo ou não ácido salicílico e seus precedentes estão descritos na Figura 24.

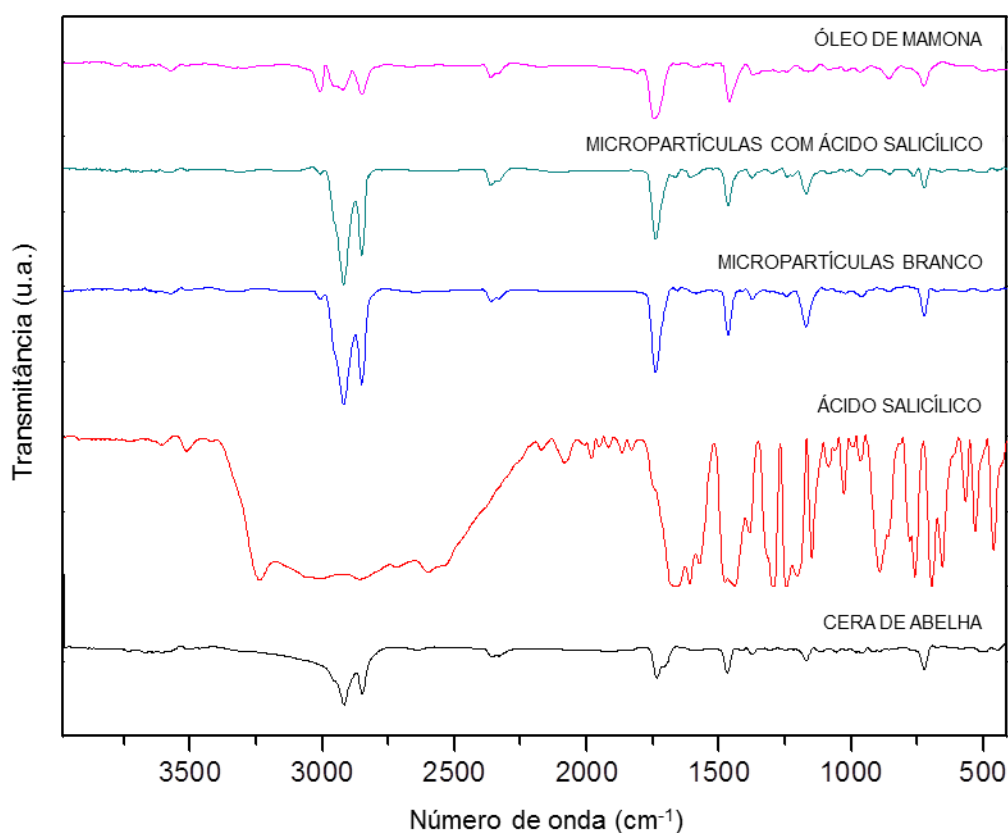


FIGURA 24 – ESPECTROS DE IVTF DA CERA DE ABELHA, ÁCIDO SALICÍLICO PURO, MICROPARTÍCULAS SEM E COM ÁCIDO SALICÍLICO E ÓLEO DE MAMONA

FONTE: CLABMU (2014)

O espectro de IVTF do ácido salicílico puro indicou bandas intensas e características aos ácidos carboxílicos. Segundo Silverstein e Webster (2000), devido à formação de ligações de hidrogênio fortes, os ácidos carboxílicos formam dímeros gerando vibrações de deformações axiais de O-H, as quais se apresentam como bandas intensas e largas, observadas entre 3.300 e 2.500 cm^{-1} , com centro de banda próximo a 3.000 cm^{-1} . As bandas de deformação axial de C-H da porção alquila mais fraca se superpõem à banda larga de O-H.

Mas, considerando que os dímeros de ácido carboxílico possuem centro de simetria, apenas a deformação axial assimétrica absorve no infravermelho. A formação de ligação hidrogênio e a ressonância enfraquecem a ligação C=O, gerando absorções em frequências menores que em monômeros. A formação de ligação hidrogênio interna reduz a frequência de absorção de deformação axial da carbonila. No caso do ácido salicílico, absorve a 1.665 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

Além disso, a insaturação conjugada com o grupo carbonila dos ácidos α,β -insaturados absorvem entre 1.710 e 1.680 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

Por fim, a deformação angular fora do plano do grupo O-H em ligação hidrogênio dos dímeros de ácido carboxílico é uma banda característica de seu espectro, ocorrendo aproximadamente a 920 cm^{-1} , como uma banda larga e de intensidade média (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2000).

O espectro de IVTF da cera de abelha apresentou uma banda de absorção de baixa intensidade em 3.677 cm^{-1} e uma banda larga em 3.435 cm^{-1} , ambas referentes ao estiramento da ligação do grupamento O-H. Bandas típicas em 2.919 e 2.850 cm^{-1} foram correspondentes à vibração de estiramento da ligação C-H e em 1.734 e 1.708 cm^{-1} ao estiramento da ligação C=O. Além disso, o estiramento da ligação C-O conduziu a formação de bandas entre 1.285 e 841 cm^{-1} e a ligação C-H apresentou bandas entre 1.467 e 1.377 cm^{-1} referentes ao seu dobramento e uma banda em 724 cm^{-1} referente à sua torção.

Ao óleo de mamona foi possível atribuir que as bandas correspondentes à presença de insaturação estão em 1.652 e 3.014 cm^{-1} ; a presença de OH em uma banda larga em aproximadamente 3.379 cm^{-1} e os grupamentos C=O e C-O-C=O nas bandas em 1.739 , 1162 e 1097 cm^{-1} , respectivamente.

Os espectros obtidos para as micropartículas desenvolvidas apresentaram bandas de absorção nas mesmas faixas de número de onda observados para os respectivos materiais de partida (cera de abelha e óleo de mamona). Portanto, é possível estabelecer que nenhuma ligação química entre o ativo (ácido salicílico) e os materiais utilizados foi formada durante o processo de microencapsulação.

5.3.2.2 Análises quantitativas

5.3.2.2.1 Titulação direta

A titulação direta do ácido salicílico recuperado das partículas mostrou-se inadequada, pois em todos os processos de recuperação o resultante era sempre um líquido esbranquiçado, dificultando a visualização do ponto de viragem do indicador, ainda que a amostra fosse centrifugada ou filtrada.

Na presença apenas de água, mesmo após aquecimento, a titulação demonstrou valores muito menores daqueles encontrados nas outras análises testadas.

Assim, essa metodologia foi abandonada devido aos melhores resultados obtidos com a titulação indireta.

5.3.2.2.2 Titulação indireta

Experimentos prévios demonstraram que na titulação básica indireta a adição de álcool etílico ou acetona à água de processo não resultou em diferença de titulação frente à água sem solventes. Assim, a metodologia definida não incluiu a adição de solvente na água proveniente da técnica de encapsulação. Esse resultado sugere a não cristalização do ácido salicílico remanescente durante as 48h de estabilização do meio.

Assim, com objetivo de eliminar possíveis interferências dos componentes da formulação, uma solução de hidróxido de sódio 0,1M foi adicionada a água de processo para posterior titulação do seu excedente, não consumido pelo ácido salicílico, com ácido acético 0,1M.

Na Tabela 9 estão descritos os valores obtidos por meio de titulação ácida indireta da água de processo proveniente da formação das partículas de cera de abelha e óleo de mamona contendo ácido salicílico.

TABELA 9 – TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DAS MICROPARTÍCULAS

Amostra nº	% de ácido salicílico encapsulado
1	79,76
2	77,59
3	79,76
Média	79,03

FONTE: O autor (2014)

Observa-se que, com a adição do óleo de mamona a formulação a porcentagem de ácido salicílico encapsulado aumentou quando comparada aos resultados obtidos por Gifani e colaboradores (2009) justificando seu uso para compor a fase cerosa das partículas.

5.3.2.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O ácido salicílico (AS) é um ácido fraco com valor de pKa próximo a 3,0, sendo necessária uma análise cuidadosa das condições cromatográficas de forma que, no momento da análise, esteja em sua forma não ionizada. O ajuste do pH da fase móvel abaixo de 3 foi suficiente para a obtenção de uma boa assimetria de pico, com um tempo de retenção de cerca de 6,8 min (TAGLIARI *et al*, 2012).

Referente ao solvente escolhido para a recuperação do ácido salicílico, o metanol mostrou-se capaz de recuperar o ácido salicílico presente nas partículas, compondo também a fase móvel da CLAE.

Conforme demonstrado na Figura 25, as micropartículas sem ácido salicílico encapsulado (branco) não apresentaram banda de absorção. A presença do fármaco foi evidenciada pelas bandas de absorção da solução padrão de ácido

salicílico e do ácido salicílico extraído das micropartículas, no mesmo tempo de retenção, com detector configurado para 280 nm, comprovando-se a presença do fármaco encapsulado, preservando sua estrutura de uma possível interação com os demais componentes das partículas.

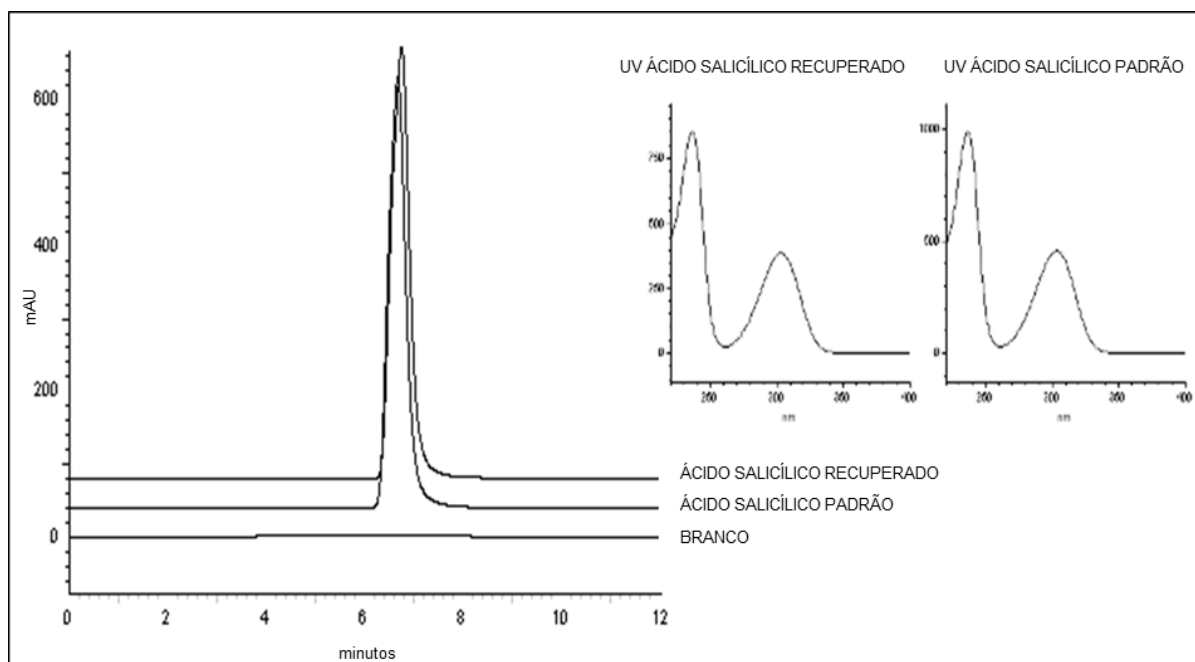


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA EM CLAE DO ÁCIDO SALICÍLICO RECUPERADO DAS PARTÍCULAS

FONTE: Laboratório de Fitoquímica Universidade Federal do Paraná (2014)

Quanto ao processo de recuperação do ácido salicílico das micropartículas lipídicas, por meio dele foi possível a visualização apenas do fármaco, sem interferência dos demais constituintes da micropartícula, demonstrado pela curva da recuperação sem ácido salicílico, identificadas como Branco na Figura 25.

Apesar de comprovada a sua presença, o ácido salicílico não pode ser quantificado por meio do primeiro método de recuperação utilizado, uma vez que uma porcentagem média de 58% de encapsulação foi obtida pela equação da reta calculada da curva de calibração do ácido salicílico em metanol, apresentada na Figura 26.

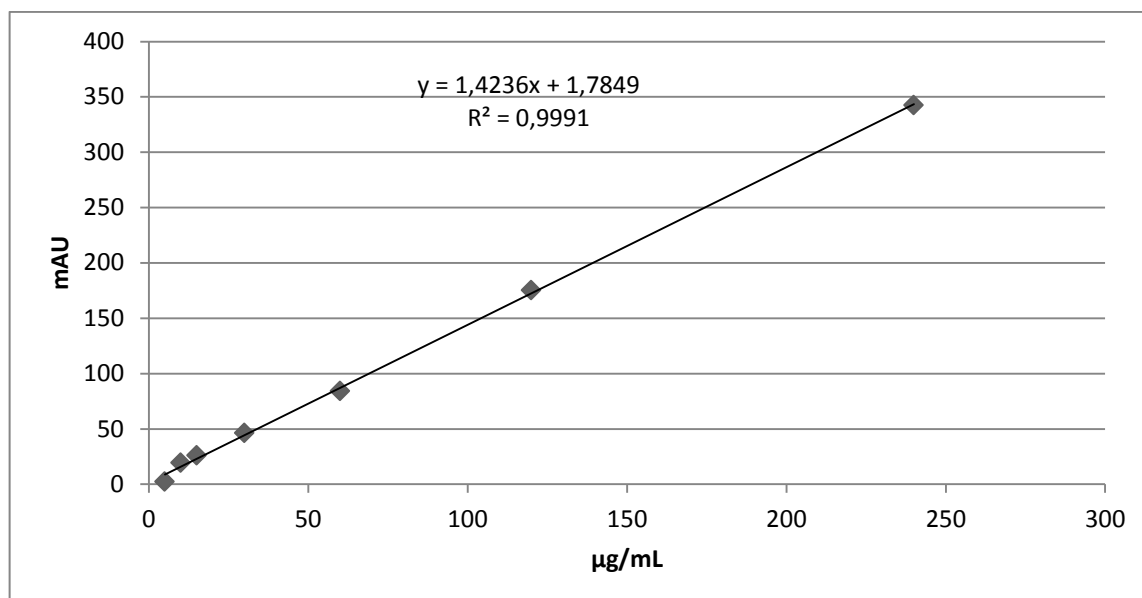


FIGURA 26 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO PARA AMOSTRAS DILUÍDAS EM METANOL

FONTE: Laboratório de Fitoquímica Universidade Federal do Paraná (2014)

Assim, uma segunda curva de calibração (Figura 27) utilizando o novo método de recuperação do ácido salicílico das micropartículas foi feita bem como um novo doseamento por CLAE com diluição da amostra em metanol/água 1:1 (v/v). Os valores calculados foram comparados com a titulação ácida indireta, conforme Tabela 10. O doseamento por CLAE das amostras com ácido recuperado das partículas diluídas apenas com metanol apresentaram resultados médios de 69,26%, considerados insuficientes. Os resultados das amostras diluídas com metanol/água 1:1 (v/v) apresentaram resultados adequados, descritos na Tabela 10.

TABELA 10 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE % DE ENCAPSULAÇÃO OBTIDOS POR CLAE E TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DO ÁCIDO SALICÍLICO RECUPERADO DAS PARTÍCULAS

AMOSTRA	CLAE (%)	TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA (% de ácido salicílico encapsulado)	DIFERENÇA %
1	80,55	79,76	0,98
2	81,19	77,59	4,43
3	80,33	79,76	0,71
MEDIA	80,69	79,03	2,05

FONTE: O autor (2014)

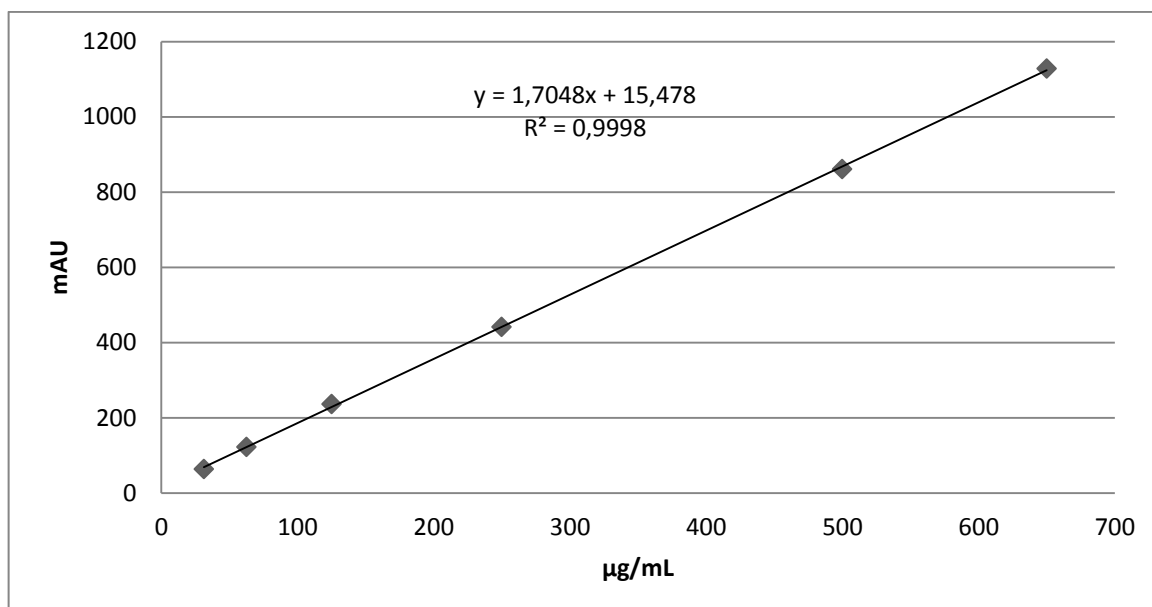


FIGURA 27 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ÁCIDO SALICÍLICO PARA AMOSTRAS DILUÍDAS EM METANOL:ÁGUA

FONTE: Laboratório de Fitoquímica Universidade Federal do Paraná (2014)

Os resultados apresentados por CLAE e titulação ácida indireta mostraram similaridade para quantificação do ácido salicílico com erros percentuais reduzidos, abaixo de 5,0%.

Quanto à quantificação do ácido salicílico não encapsulado, presente na água de processo, obtida por CLAE, os valores foram calculados por meio da curva de calibração descrita na Figura 28 e também por titulação ácida indireta, conforme Tabela 11.

TABELA 11 – COMPARAÇÃO DOS VALORES DE % DE ENCAPSULAÇÃO OBTIDOS POR CLAE E TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA DA ÁGUA DE PROCESSO

AMOSTRA	CLAE (%)	TITULAÇÃO ÁCIDA INDIRETA (% de ácido salicílico não encapsulado)	DIFERENÇA (%)
1	19,97	19,04	4,65
2	20,04	19,04	4,99
3	20,51	20,77	1,25
Média	20,17	19,61	2,74

FONTE: O autor (2014)

Os resultados apresentados por CLAE e titulação ácida indireta para água de processo mostraram da mesma forma que anteriormente, similaridade entre os métodos utilizados para quantificação do ácido salicílico com erros percentuais reduzidos abaixo de 5,0%.

Dessa forma, pode-se concluir que os métodos são equivalentes.

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, micropartículas lipídicas contendo ácido salicílico foram obtidas com sucesso pela metodologia de emulsificação/solidificação.

Valores elevados de microencapsulação foram obtidos por melhorias na metodologia descrita por Gifani e colaboradores (2009) como a incorporação do óleo de mamona à cera de abelha bem como pela alteração de alguns parâmetros críticos ao processo de formação das partículas. A proporção de 10:10 cera de abelha:óleo de mamona (p/p) foi estabelecida como a mais adequada, com melhora superior a 30% na eficiência de encapsulação pelas metodologias de CLAE e titulação ácida indireta quando comparadas a metodologia descrita por Gifani e colaboradores (2009).

Pela metodologia de microscopia eletrônica de varredura as partículas obtidas foram analisadas morfolologicamente. Já pelas técnicas de Calorimetria Exploratória Diferencial e Difração de Raios X verificou-se a presença do ácido nas partículas, com amorfização e distribuição uniforme, a nível molecular. Além disso, não foram verificadas ligações químicas entre os materiais utilizados e o ácido salicílico, verificado pela Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier.

Por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência o ácido salicílico encapsulado (recuperado das partículas) e aquele não encapsulado (presente na água de processo) foi quantificado e mostrou valores comparáveis a titulação ácida indireta, com variação entre as metodologias inferior a 5%.

Com a nova metodologia proposta, cerca de 80% do ácido salicílico pode ser encapsulado, obtendo-se partículas adequadas ao uso dermatológico, esféricas e macias ao toque.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.J.; MULLER, R.H.; SOUTO, E.B. Topical delivery of oily actives using solid lipid particles. **Pharmaceutical Technology Europe**, v.19, p.28, 2007.

ANFARMAG. **Manual de Incompatibilidades**. São Paulo: Publicações Anfarmag. 248p. 2001.

ANSARI, K. A.; *et al.* Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: *in vitro* characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study. **American Association of Pharmaceutical Scientists** v. 12, n. 1, p. 279-286, 2011.

ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª Edição, Brasília: Fiocruz, 2010.

ARAVINDARAM, A.S. *et.al.* Encapsulation of olanzapine into waxes/fat microspheres: preparation, characterization and release kinetics. **Pharmacy**, v.48, p.9329-9335, 2012.

ATTAMA, A. A.; SCHICKE, B. C.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Further characterization of theobroma oil - beeswax admixtures as lipid matrices for improved drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, n.3, p.294-306, 2006.

AYATOLLAHI S. *et al.*. Radiation chemistry of salicylic acid and methyl substituted salicylic acids: Models for the radiation chemistry of pharmaceutical compounds. **Radiation Physics and Chemistry**, v.92, p. 93-98, 2013.

BAUMANN, L. **Dermatologia Cosmética**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004. p. 342.

BOLZINGER, M. *et.al.* Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.17, p.156-165, 2012.

CALERO, J. *et.al.* Elaboración y caracterización de microcápsulas gastrorresistentes de diclofenac obtenidas por gelificación iónica. **Universitas**, v.1, n.2, p.27-30, 2008.

CANEVAROLO JR., S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber Editora, 2004.

CASTELLI, F. *et.al.* Characterization of indomethacin-loaded lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**. v.304, n.1-2, p. 231-238, 2005.

CHAN, L.W.; LIM, L.T.; HENG, P.W.S. Microencapsulation of oils using sodium alginate. **Microencapsulation**, v.17, n. 6, p.757-766, 2000.

CHEN, H.; CHANG, X.; DU, D.; LIU, W.; LIU, J.; WENG, T.; YANG, Y.; XU, H.; YANG, X. CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. New York: Marcel Dekker. 2 Ed. Revised and Expanded, p. 295, 1992.

CONTRI, R.V. *et al.* Transport of substances and nanoparticles across the skin and *in vitro* models to evaluate skin permeation and/or penetration. In: BECK, R. *et.al.* **Nanocosmetics and Nanomedicines**. Rio Grande do Sul: Springer, 2011. p. 1-2.

Controlled Release. v. 110, n. 2, p. 296 – 306, 2006.

DALTIN, D. **Tensoativos: química, propriedades e aplicações**. São Paulo: Blucher, 2012.

DISALVO, R. Salicylic acid: a multifunctional cosmetic ingredient. **The chemistry and manufacture of cosmetics**, v.3, 2002.

DURACHER, L. *et.al.* Irradiation of skin and contrasting effects on absorption of hydrophilic and lipophilic compounds. **Photochemistry and Photobiology**, v.85, p.1459-1467, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. **The EFSA Journal**, v. 615, p.1-28, 2007.

FLUHR J. W.; CAVALLOTTI C.; BERARDESCA, E. *et al.* Emollients, moisturizers, and keratolytic agentes in psoriasis. **Clinics in Dermatology**, v.26, p.380-386, 2008.

FLYNN, T.C. *et al.* Dry Skin and Moisturizers. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.387-392, 2001.

FNAP. **Manual de boas práticas na produção de cera de abelha: princípios gerais**. Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, Bragança, 2009.

FREITAS, S.; MERKLE, H.P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n.2, p.313-332, fev. 2005.

FSSAI. Manual of methods of analysis of foods. **Food Additives**, 2012.

GIANNOLA L. I.; DE CARO, V.; RIZZO, M. C. Preparation of white beeswax microspheres loaded with valproic acid and kinetic study of drug release. **Drug Dev Ind Pharm**, v.21, p. 793-807, 1995.

GIFANI, A. *et.al.* Preparation and investigation the release behaviour of wax microspheres loaded with salicylic acid. **Journal of Microencapsulation**, v.26, p. 485-492, 2009.

GOI, A.; VERESSININA, Y.; TRAPIDO, M. Degradation of salicylic acid by Fenton and modified Fenton treatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 143, p. 1-9, 2008.

GOWDA, D.; SHIVAKUMAR, H. Preparation and evaluation of waxes/fat microspheres loaded with lithium carbonate for controlled release. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.69, n.2, p.11-29, 2007.

GOWDA, D.V. *et.al.* Encapsulation of clozapine into beeswax microspheres: preparation, characterization and release kinetics. **International Journal of PharmTech Research**, v.3, n.4, p. 2199-2207, 2011.

GOWDA, D.V. *et.al.* Encapsulation of clozapine into beeswax microspheres: preparation, characterization and release kinetics. **International Journal of PharmTech Research**, v.3, n.4, p. 2199-2207, 2011.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de Cosmetologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, p. 353, 1999.

HUMBERT, B.; ALNOT, M.; QUILÈS, F. Infrared and Raman spectroscopical studies of salicylic and salicylate derivatives in aqueous solution. **Spectrochimica Acta Part A**, v.54, p. 465-476, 1998.

IONASHIRO, M. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial, Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Giz Editorial, 2004.

IQBC. **Ficha de informações de segurança do ácido salicílico**. 2004.

JABARAH, A.; GILEAD, L.T.; ZLOTOGORSKI, A. Salicylate intoxication from topically applied salicylic acid. **Journal of European Academy of Dermatology and Venereology**, v.8, p.41-42, 1997.

JENNING, V. *et al.* Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 49, p.211-218, 2000.

JI, J. *et.al.* Preparation, characterization and in vitro release of chitosan nanoparticles loaded with gentamicin and salicylic acid. **Carbohydrate Polymers**. v. 85, p. 803-808, 2011.

JOUYBAN, A.; AZAR, V.P.; KHOMSARI, F. Solubility of salicylic acid in ethanol, propylene glycol, and N-methyl-2-pyrrolidone at various temperatures and their binary mixtures at 298.2K. **Journal of Molecular Liquids**, v.160, p.14-16, 2011.

JYOTHI *et al.* Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of Microencapsulation**, v.27, n.3, p.187-197, 2010.

KARIM, M.M. *et al.* Analysis of salicylic acid based on the fluorescence enhancement of the As(III)-salicylic acid system. **Analytica Chimica Acta**, v.576, p. 136-139, 2006.

KATSAMBAS, A.D.; STEFANAKI, C.; CUNLIFFE, W.J. Guidelines for treating acne. **Clinics in Dermatology**, v.22, p. 439-444, 2004.

KEDE, M.P.V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo: Atheneu, p.795, 2004.

KERMANY, B.P. **Carbopol Hydrogels for topical administration: treatment of wounds**. 72f. Tese (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Tromso, 2010.

KLIGMAN, D. Technologies for cutaneous exfoliation using salicylic acid. **Dermatology Therapy**, v.14, p.225-227, 2001.

KORNHAUSER, A. *et.al.* The effects of topically applied glycolic acid and salicylic acid on ultraviolet radiation-induced erythema, DNA damage and sunburn cell formation in human skin. **Journal of Dermatological Science**, V.55, P.10-17, 2009.

KRAUTHEIM, A.; GOLLNICK, H.P.M. Acne: Topical Treatment. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p. 398-407, 2004.

LACERDA, S.P. **Carreador lipídico nanoestruturado à base de cera de carnaúba: desenvolvimento, caracterização e uso na encapsulação de benzofenona-3**. 189. Dissertação – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

LIBERAL, J.P.M. **Desenvolvimento e caracterização de comprimidos matriciais de dupla camada contendo Paracetamol**. 112f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal, 2008.

LIM, S.J.; KIM C.K. Formulation parameters determining the characteristics physicochemical of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 243, p.135-146, 2002.

LODEN, M. The skin barrier and use of moisturizers in atopic dermatitis. **Clinics in Dermatology**, v.21, p. 145-157, 2003.

LÓPEZ,C.R.; FERNANDEZ, A.M.J. Microencapsulacion. In: VILA JATO, J.L. **Tecnología farmacéutica I: aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas**. Madrid: Síntesis, p.577-608, 2001.

MAGILL, M. Microencapsulamento. **Cosmetics & Toiletries**, Estados Unidos, v. 3, p. 55-57, mar/abril. 1991.

MARCATO, P. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. VI, n.2, p. 1-37, 2009.

MAZZANTI, G. et al. Effect of minor components and temperature profiles on polymorphism in milk fat. **Crystal Growth and Design**, v. 4, n. 6, p. 1303-1309, 2004.

MULLER, R.H. *et.al*. Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 41, p.423-427, 2002.

MÜLLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics**, 50, p. 161-177, 2000.

MÜLLER, R.H., RADTKE, M., WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 54, Suppl. 1, S131 – S155, 2002a.

MÜLLER, R.H., RADTKE, M.; WISSING, S. A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 242, p.121–128, 2002b.

NORDSTRÖM, F.L.; RASMUNSON, A.C. Solubility and melting properties of salicylic acid. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v.51, p.1668-1671, 2006.

NUNES, L.A. *et al.* **Produção de cera**. Série Produtor Rural nº52, São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2012.

PASSERINI, N. *et al.* Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v.88, n.2, p. 263-275, 2003.

PERSSONELLE, J. G. **Cosmiatria**: A Ciência da Beleza. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter, 2004. 244p.

PIRES, R.F.; FRANCO JR, M.R. Solubility of salicylic acid in water + salt (NaCl, KCl, NaBr, Na₂SO₄ and K₂SO₄) at 392.5-313.3 K. **Fluid Phase Equilibria**, v. 330, p.48-51, 2012.

PONCELET, D. Microencapsulation: Fundamentals, methods and applications. **Surface Chemistry in Biomedical and Environmental Science**, parte 1, p.23-34. 2006.

PUBCHEM. Disponível em:
<<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=338>>. Acesso em 20/11/2013.

RAGHUVANSHI, R.S. *et al.* Release kinetics of salbutamol sulfate from wax coated microcapsules and tableted microcapsules. **Journal of Microencapsulation**, v.9, p.449-455, 1992.

RAMANATHAN, S.; HEBERT, A.A. Management of Acne Vulgaris. **Journal of Pediatric Health Care**, Texas, v.25, n.5, p.332-337, set./out. 2011.

RIBEIRO, A. J. *et.al.* Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.187, p.115-123, 1999.

RINALDI, F.; CLEMENTE, F. The importance of the formulation of a plaster containing salicylic acid in treatment of corns. **The foot**, v.4, p.186-190, 1994.

RODRIGUES-RACK *et.al.* Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura do leite e óleo de girassol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 258-267, 2010.

ROSSAN, M.R. **Preparação e caracterização de micro e nanopartículas lipídicas sólidas para aplicação em cosméticos**. 215. Dissertação – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2011.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. V.3, ed.16, p.26-30, 2000.

SANTOS, M.S. *et.al.* **Entropia de fusão para substâncias graxas e biodiesel**. FURG, 2009.

SCCNFP. **Opinion of the scientific committee on cosmetic products and non-food products intended for consumers concerning salicylic acid**, Europa: SCCNFP, 2002. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sccp/out170_en.pdf>. Acesso em: 15/04/2014.

SCHNEIDER, R.C.S. **Extração, caracterização e transformação do óleo de rícino**. 240. Tese – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2003.

SHAH, S.P. **Preparation and evaluation of tableted microspheres of ibuprofen encapsulated in beeswax**. 75f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade de Georgia, Georgia, 2004.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2000.

SOUTO, E.B. *et.al.* Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1762-1769, 2011.

SUAVE, J. *et al.* Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v.7, n.2, p.12-20, dez.2006.

TAGLIARI, M.P. *et.al.* Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, v. 35, n.6, p.1228-1232, 2012.

TORRIERO, A.A.J. *et al.* Voltammetric determination of salicylic acid in pharmaceuticals formulations of acetylsalicylic acid. **Talanta**, v. 62, p.247-254, 2004.

TOXNET. Toxicology Data Network. **NLM**. Disponível em < <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+672>>. Acesso em: 05/06/2013.

VARSHOSAZ, J.; KEIHANFAR, M. Development and evaluation of sustained-release propranolol wax microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v.18, p. 277-248, 2001.

VAZQUEZ, L.C.M.; MORENO, B.N.; SANCHEZ, J.C.M. La capa córnea: mucho más que una barrera inerte. Implicaciones en los tratamientos cosméticos. **Formacion Continuada em Dermatologia**, Espanha, v. 26, n.8, p.412-419, 2011.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. **Cosmiatria II**. 2 ed. Argentina: AP Americana de Publicaciones, 1991. 406p.

WISSING, S.A.; KAYSER, O.; MÜLLER, R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p.1257-1272, 2004.

WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). **International Journal of Pharmaceutics**. V. 254, p. 65-68, 2003.

YAN, Y.D. *et.al.* Evaluation of physicochemical properties, skin permeation and accumulation profiles of salicylic acid amide prodrugs as sunscreen agent. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, v. 419, p. 154-160, 2011.

ZHU, L. *et al.* Encapsulation of Menthol in Beeswax by a Supercritical Fluid Technique. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2010, p. 1-7, nov. 2010.